

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

QUELQUES ASPECTS DE LA TOLÉRANCE IMMUNOLOGIQUE A L'ÉGARD D'ANTIGÈNES DÉFINIS (*)

par B. CINADER (**).

*(Department of Medical Biophysics, University of Toronto,
Subdivision of Immunochemistry,
Division of Biological Research, Ontario Cancer Institute,
Toronto, Canada).*

INTRODUCTION

Dans la présente conférence nous formulerons une hypothèse concernant un mécanisme d'orientation de la réaction de synthèse des anticorps.

Ce mécanisme contribuerait à assurer la spécificité des anticorps formés et aurait un caractère génétique. Après avoir formulé cette hypothèse, nous en exposerons les prémisses, puis en détaillerons les preuves expérimentales qui suggèrent que la réaction de synthèse des anticorps a un caractère héréditaire.

Les animaux paraissant être tolérants [1, 2, 3] à leurs propres antigènes circulants, et par conséquent, à de très nombreux déterminants antigéniques, un déterminant antigénique d'une protéine

(*) Je tiens à remercier le Dr R. Côté et la Dr A. Bussard de leur aide si précieuse pour la traduction de cette conférence.

(**) Conférence prononcée le 24 mai 1960 dans le Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur, Paris.

étrangère ne peut être immunogénique qu'à la condition d'être différent de tous les déterminants antigéniques de l'organisme que l'on tente d'immuniser. La spécificité de la « réponse immunitaire » dépendrait donc de la relation existant entre la structure des antigènes autologues et celle des antigènes hétérologues.

Bien plus, les déterminants antigéniques pouvant présenter une variabilité intraspécifique, d'un individu à l'autre, les motifs immunogènes, sur une protéine hétérologue, ne seraient pas nécessairement les mêmes pour deux individus de la même espèce.

Comme la structure de ces motifs est déterminée génétiquement « la réponse immunitaire » des animaux à qui ils sont administrés le serait aussi. La validité de cette hypothèse dépend des prémisses suivantes :

La tolérance immunologique envers des antigènes définis est un phénomène aussi général que la « réponse en anticorps » elle-même. Elle dépend des déterminants chimiques individuels de l'antigène et non pas exclusivement de l'antigène considéré comme un tout. Si deux antigènes ont en commun un ou plusieurs motifs, la tolérance envers un antigène peut affecter la réponse en anticorps à l'égard de l'autre substance. Comme la tolérance immunologique envers des antigènes hétérologues est un phénomène général, on peut supposer qu'elle peut être induite envers des protéines autologues et que les conclusions qui sont valides pour la tolérance envers des protéines hétérologues le sont aussi dans le cas des protéines autologues. Finalement, les protéines autologues de divers individus diffèrent quant à la séquence des acides aminés (et quant à la structure secondaire) et ces différences sont déterminées génétiquement de manière directe.

Avant de discuter les conséquences de ces idées, nous en examinerons la validité.

LA TOLÉRANCE ENVERS DES PROTÉINES DÉFINIES COMME PHÉNOMÈNE GÉNÉRAL.

L'injection d'une protéine hétérologue à un animal nouveau-né, supprime ou réduit la formation d'anticorps envers cet antigène particulier lorsque cet animal devenu adulte est soumis à des injections de cette protéine [4, 21].

La tolérance immunologique dite « acquise » a été induite chez des lapins, des veaux, des oiseaux, des souris, et les antigènes utilisés ont été des sérumalbumines diverses, de la ribonucléase, de l'azosérumalbumine et des extraits de levure. Qu'un mécanisme général soit en cause, cela est suggéré par la liste déjà respectable des antigènes variés employés et des différentes espèces animales mises en cause.

Quelques expériences semblent ne pas justifier cette générali-

sation. Selon certains rapports, la tolérance peut être de courte durée chez les poulets [13, 20] et probablement les lapins [14, 15] et les souris [16], et peut exiger pour son entretien, une stimulation par l'antigène durant la vie adulte. Il n'est pas nécessaire de considérer ici la signification générale de ces résultats [voir 22], puisque, dans le problème étudié, l'antigène serait disponible durant la vie adulte. D'autre part, il a été fait mention à plusieurs reprises, de tentatives sans succès pour induire la tolérance immunologique, en particulier lorsque des globules rouges sont injectés à la naissance. Ces cas doivent être examinés de façon détaillée, car ils infirment l'hypothèse de la tolérance posée comme un phénomène général.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR L'INSUCCÈS DANS L'INDUCTION DE LA TOLÉRANCE.

S'il existe une certaine relation, pour l'induction de la tolérance, entre la dose et la réponse [21] cela peut, sans aucun doute, expliquer certains des échecs constatés. En effet, la démonstration de la tolérance exigerait qu'on pût impressionner chacune des cellules productrices d'anticorps ou leur cellule mère ; si seulement une proportion relativement faible de ces cellules était affectée par l'antigène, la légère diminution dans la production d'anticorps qui en résulterait pourrait passer inaperçue par suite de la grande variabilité individuelle des lapins normaux dans la capacité à produire des anticorps. D'autre part, si la dose injectée à la naissance est telle qu'une très petite proportion de cellules productrices d'anticorps demeure non influencée, une immunisation prolongée devrait être nécessaire pour permettre à ces cellules de se multiplier suffisamment et de produire des anticorps en quantité décelable. En conséquence, durant les premiers stades de l'immunisation, aucun anticorps ne semblerait être synthétisé, alors que, plus tard, après des injections répétées, les anticorps seraient produits en quantité décelable.

Cependant, il est possible d'expliquer autrement quelques unes des tentatives infructueuses dans l'induction de la tolérance. En effet, un résultat négatif peut être interprété non pas comme étant un échec à induire la tolérance, mais plutôt comme un insuccès à démontrer qu'elle a été induite. Cela peut se produire si l'on confond, chez l'adulte, les anticorps formés contre des impuretés de la substance injectée à la naissance (préparation hétérogène) avec des anticorps correspondant à l'antigène principal, anticorps qui, en fait, n'existent pas, l'organisme étant bien resté tolérant à l'égard de cet antigène principal. Pour illustrer ce mécanisme, nous décrirons en détail quelques expériences, que nous avons effectuées en collaboration avec M. Carter, expé-

riences au cours desquelles des impuretés antigéniques se trouvaient présentes en quantité trop faible pour susciter la tolérance, mais suffisante pour faire apparaître des anticorps chez l'animal adulte.

Expérience illustrant l'effet des impuretés antigéniques.

L'expérience que nous décrivons [49] semble, à première vue, s'être soldée par un insuccès à induire la tolérance immunologique ; cependant, une analyse plus attentive des résultats, montre que la tolérance avait été bel et bien induite, mais des impuretés à l'état de traces dans l'antigène purifié utilisé avaient donné lieu à la formation d'anticorps chez les animaux adultes. Ces expériences ont été faites avec des chèvres ayant subi des injections d'albumine humaine immédiatement après leur naissance. A l'âge adulte, ces animaux et les témoins furent immunisés par de l'albumine humaine, en deux séries d'injections et les titrages des sérums furent faits par l'agglutination de globules rouges tannés et sensibilisés avec l'albumine humaine.

Les deux groupes d'animaux variaient relativement peu, l'un par rapport à l'autre, en ce qui concerne les titres d'agglutination de leurs sérums.

Cependant, en essayant les mêmes sérums par la méthode de précipitation quantitative, on ne trouva aucun anticorps du type précipitant dans les sérums des animaux traités à la naissance, alors qu'on en rencontra dans chacun des sérums des animaux témoins. Une chose était probable ; les animaux tolérants auraient formé des anticorps dissociables et non précipitants, c'est-à-dire incapables, seuls, de précipiter l'antigène, mais capables de le faire en présence d'anticorps précipitants. Une technique de co-précipitation fut donc essayée, consistant à mélanger à volume égal deux sérums, l'un riche en précipitines, l'autre dénué de précipitines. Là encore, chez les animaux immunisés à la naissance, on ne trouva aucun anticorps précipitant, alors qu'avec les autres on obtint des titres en anticorps variant entre 440 et 14 μ g d'azote par ml de sérum. Ainsi, selon la méthode utilisée pour vérifier si la tolérance avait été induite, on avait un résultat négatif ou positif. Cela pouvait s'expliquer de deux façons :

1° La tolérance immunologique acquise ne consisterait pas en une inhibition complète de la « réponse » en anticorps, mais en une modification du mécanisme de synthèse telle que l'anticorps résultant s'unirait avec l'antigène de façon très dissociable.

Au cours de ce travail, nous avons pu rejeter cette possibilité, qui peut toutefois s'appliquer fort bien dans d'autres situations. (Cf. observation faite par Bussard sur la déshydrogénase de la levure [48]).

2° Ou bien, il s'agirait d'une impureté antigénique présente en trop faible quantité pour induire la tolérance, mais capable, à la suite d'une immunisation prolongée, de susciter la formation d'anticorps.

L'hémagglutination est une méthode beaucoup plus sensible que la précipitation. La contradiction entre les résultats fournis par ces deux méthodes pouvait-elle être due à la plus grande sensibilité de la technique d'hémagglutination, qui aurait décelé une concentration en anticorps d'un ordre de grandeur complètement différent de celui atteint par la méthode de précipitation ? On doit se rappeler ici, que les titres d'agglutination étaient du même ordre de grandeur pour les animaux traités à la naissance et les témoins. Néanmoins, la sensibilité relative des méthodes d'agglutination et de précipitation pouvait encore être mise en cause, si le titre d'hémagglutination n'était pas une fonction linéaire de la concentration en anticorps ou, en d'autres termes, si l'azote des anticorps et le titre d'hémagglutination n'étaient pas proportionnels. Il fallait un examen de ces deux points avant de mettre hors de cause cette banale explication des contradictions entre les deux sortes d'essais. Cette possibilité fut exclue par la démonstration que les relations en cause sont approximativement linéaires, ce qui exclut, comme explication plausible, la sensibilité différente des deux méthodes employées.

La façon dont un antigène disparaît peut fournir une information que les essais sur les titres en anticorps sont incapables de révéler. En effet, on peut ainsi démontrer une quantité d'anticorps suffisamment faible pour être complètement neutralisée par l'antigène circulant, mais assez grande pour réduire la vitesse d'élimination de l'antigène [9]. Nous avons alors examiné les animaux traités à la naissance par cette troisième technique, qui, elle, peut révéler la formation des anticorps, à savoir : l'analyse de l'élimination de l'antigène de la circulation. De cette façon, nous avons appris que parmi les animaux traités à la naissance, une moitié éliminait l'antigène en deux phases, tandis que l'autre moitié le faisait en trois étapes ; en bref, ces derniers fournissaient une indication claire que l'anticorps était présent. Nous obtenions ainsi une troisième réponse à notre question : 50 p. 100 des animaux étaient tolérants, 50 p. 100 ne l'étaient pas (tableau I).

Ainsi, trois techniques différentes, la mesure du titre d'agglutination, l'essai de précipitation quantitative et l'examen de l'élimination de l'antigène, nous avaient fourni trois résultats apparemment différents.

Sur ces entrefaites, nous fîmes une observation qui semblait confirmer notre impression que nous avions affaire à un complexe antigène-anticorps soluble dans le cas des chèvres traitées à la naissance. En effet, au tout début de l'élimination de l'antigène,

nous décelâmes, par hémagglutination passive, la présence simultanée d'anticorps et d'antigène (fig. 1).

Ces observations pouvaient être dues à la présence d'un complexe dissociable, si la possibilité était rejetée que ces résultats contradictoires étaient causés par une impureté antigénique. Pour cela, il fallait prouver que l'antigène en circulation était celui qui avait suscité l'apparition de l'anticorps, preuve que pouvaient fournir des essais d'inhibition de l'hémagglutination.

TABLEAU I.

	ESSAIS SUR L'IMMUN-SÉRUM		
	$\mu\text{g N}$ précipitable /ml (*)	Inverse du titre d'agglutination	Élimination de l'albumine humaine
<i>Chèvres traitées à la naissance :</i>			
N° 78	aucun décelable	20 000	triphasée
N° 83		2 000	diphasée
N° 84		200	diphasée
N° 84		< 10	diphasée
N° 87		2 000	triphasée
N° 88		200	triphasée
<i>Chèvres non traitées à la naissance :</i>			
N° 79	438	50 000	—
N° 86	158	10 000	—
N° 90	98	20 000	—
N° 93	124	10 000	—
N° 94	41	2 000	—
N° 95	14	2 000	—

(*) Détermination faite par coprécipitation.

Cette technique se résume à l'addition d'antigène soluble au sérum avant l'agglutination. Le pouvoir agglutinant du sérum ainsi absorbé se trouve diminué si l'antigène ajouté au sérum est identique à l'antigène dont on a recouvert les globules rouges devant être soumis à l'action des anticorps agglutinants. Dans le cas d'antigènes identiques, le pouvoir agglutinant du sérum décroît au fur et à mesure que croissent les quantités d'antigène ajouté au sérum avant l'agglutination. Un anticorps dirigé contre l'albumine humaine sera donc inhibé par l'albumine humaine, dont les différentes préparations, toutes d'une pureté de plus de 90 p. 100, auront un pouvoir inhibiteur égal. D'autre part, si l'anticorps a été provoqué non par l'albumine humaine, mais par

une impureté antigénique, il s'ensuivra que le pouvoir inhibiteur de différentes préparations d'albumine humaine pourra varier. Les préparations résultant de techniques diverses sont susceptibles de contenir des impuretés en quantités différentes et, dès lors, pourront varier appréciablement en pouvoir inhibiteur. Bien entendu, seuls les résultats positifs peuvent être significatifs, puisqu'un résultat négatif peut être attribué à la présence de l'impureté antigénique dans les mêmes proportions dans les deux

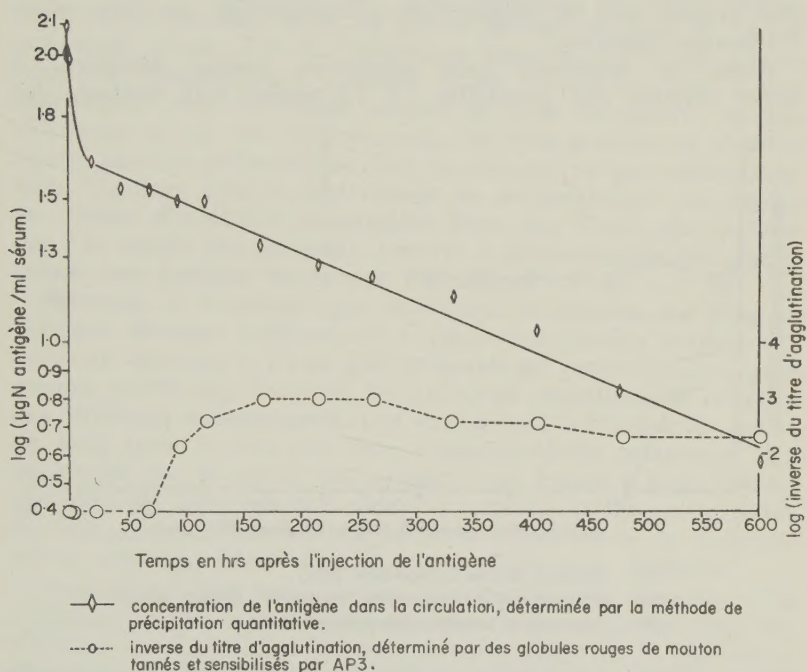


FIG. 1. — Elimination de l'antigène dans la circulation d'une chèvre adulte (traitée à la naissance par l'antigène), et montée de l'anticorps agglutinant dans le sérum. Présence simultanée d'antigène et d'anticorps dans le sang circulant d'une chèvre adulte traitée à la naissance par une préparation d'albumine humaine (AP3).

préparations d'albumine. Cette explication devenait toutefois de moins en moins plausible avec un nombre croissant de préparations d'albumine faites suivant des fractionnements différents.

Les sérums obtenus à la fin des expériences d'élimination furent les premiers soumis aux essais d'inhibition, alors qu'on compara le pouvoir inhibiteur d'une préparation d'albumine AP3

(fractionnement par l'éther, Kekwick et Mackay) et d'albumine « purissimum » venant des Behring Werke (Marburg, Allemagne de l'ouest). Il y avait une différence notable dans le pouvoir inhibiteur de ces deux préparations (fig. 2). Des expériences avec d'autres préparations d'albumine, de même qu'avec des préparations d'alphaglobuline, aboutirent à montrer que l'haptoglobine était l'inhibiteur le plus efficace (fig. 2). Il était donc vraisemblable que, chez les animaux traités à la naissance, l'anticorps fût dirigé contre une protéine présente en concentration plus grande dans les préparations d'haptoglobine que dans celles d'albumine humaine.

Avant de considérer cette conclusion comme définitive, il fallait éliminer une possibilité : si l'albumine était déplacée des

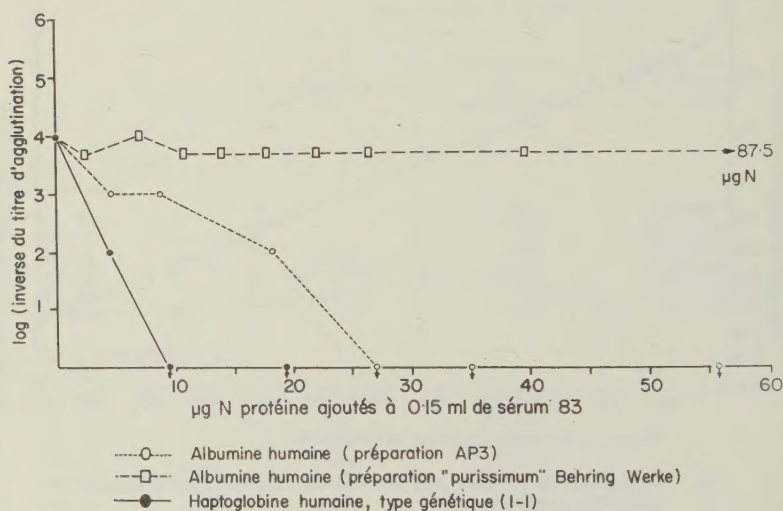


FIG. 2. — Emploi de la technique d'inhibition de l'agglutination pour la détection de l'hétérogénéité moléculaire dans la spécificité de l'anticorps. Anticorps chez les chèvres tolérantes à l'albumine humaine. Spécificité de l'anticorps trouvé dans le sérum d'une chèvre traitée à la naissance par l'albumine humaine (AP3) et ultérieurement immunisée par le même antigène. Inhibition par diverses préparations protéiques de l'agglutination de globules rouges tannés et sensibilisés par l'albumine humaine (AP3).

globules rouges tannés et sensibilisés, il se produirait une inhibition, qui ne serait évidemment pas l'inhibition des anticorps. Soit la série des faits suivants : un antigène B est ajouté au sérum mais ne s'y combine pas ; lorsque ce sérum ainsi traité est ultérieurement mis au contact de globules rouges tannés et sensibilisés par l'albumine humaine, l'antigène B déplace l'alu-

mine humaine recouvrant les globules rouges et, comme résultat net, ces hématies ne sont plus agglutinées par un anticorps anti-albumine humaine. Si ces événements se produisaient, les résultats observés différeraient très peu de ce qui se passerait dans le cas d'une combinaison réelle de l'antigène avec l'anticorps, qui le rendrait incapable de se lier avec l'albumine recouvrant les globules rouges. Il était facile de vérifier s'il y avait déplacement. Les hématies furent sensibilisées par la préparation d'albumine AP3, marquée par de l'iode radioactif, et, après lavage, elles furent incubées avec un sérum normal et dilué de chèvre contenant, d'une part, de l'albumine humaine (AP3), et, d'autre part, de l'haptoglobine, pendant qu'un lot témoin était incubé uniquement avec un sérum normal et dilué de chèvre. Aucune différence ne put être trouvée entre les trois groupes de globules traités par ces préparations. Par conséquent, on put raisonnablement conclure que le déplacement ne se produisait pas et que les essais d'inhibition montraient bien que l'anticorps présent dans le sérum des animaux injectés à la naissance était dirigé contre une protéine autre que l'albumine.

Il restait à examiner par inhibition les sérums de tous les animaux devenus tolérants et à les comparer aux sérums des animaux témoins, à l'aide des préparations protéiques qui nous avaient permis de discerner les anticorps anti-albumine humaine des anticorps anti-impureté. Ces expériences faites sur les prises de sang après la seconde série d'immunisations prouvèrent formellement que le sérum des animaux non traités à la naissance, contenait des anticorps anti-albumine humaine, tandis que le sérum de cinq animaux sur les six traités à la naissance ne contenait aucun anticorps décelable vis-à-vis de l'albumine humaine.

Néanmoins, chez trois chèvres qui avaient été inoculées à la naissance, l'antigène avait été soustrait de la circulation dans une troisième phase rapide, qui est caractéristique de la production d'anticorps, mais, malgré cela, nous ne pouvions pas nécessairement en déduire que l'anticorps fût dirigé contre l'albumine humaine. Si deux antigènes sont éliminés en même temps, leurs vitesses relatives de disparition de la circulation sanguine durant la première phase d'élimination et, particulièrement dans la seconde phase de destruction métabolique, peuvent être tout à fait différentes.

La formation d'anticorps débute plusieurs jours après l'injection. A ce moment-là, la composition relative des deux antigènes peut être complètement différente de celle du mélange initialement injecté, et il se peut qu'au moment de la troisième phase d'élimination (par l'anticorps), un seul des deux antigènes demeure en circulation, et que l'élimination observée soit celle de cet antigène résiduel. Toutefois, cela devient invraisemblable, si l'azote

hétérologue (sous forme d'antigène) laissé dans la circulation sanguine au début de l'élimination par l'anticorps existe en quantité supérieure à celle du second antigène dans la préparation protéique injectée au départ.

D'après les analyses faites, on dut conclure que l'élimination d'antigène était bien celle de l'albumine humaine chez les trois chèvres en observation. Le résultat final s'établissait donc ainsi : il y avait eu induction de la tolérance chez trois des six chèvres traitées dès la naissance [49].

Pour les raisons données plus haut, on chercha une indication sur la nature et la quantité de l'impureté dans AP3, contre laquelle il y avait eu synthèse d'anticorps chez les animaux tolérants à l'albumine humaine.

Des expériences antérieures, avec AP3, avaient montré chez cet antigène, la présence d'une α_1 et d'une α_2 -globuline, et un anticorps contre l'une d'elles fut décelé par immunoélectrophorèse chez des sérums de chèvres immunisées, alors qu'aucun des animaux traités à la naissance ne possédait d'anticorps précipitants vis-à-vis d'un antigène quelconque. Les expériences décrites précédemment suggéraient l'haptoglobine comme impureté contre laquelle les chèvres, tolérantes à l'albumine humaine, avaient formé un anticorps.

On vérifia cette hypothèse en comparant le pouvoir de liaison en hémoglobine de la préparation d'haptoglobine avec celui de la préparation d'albumine AP3 et, d'autre part, en comparant le pouvoir d'inhibition par hémagglutination passive de ces deux préparations protéiques, au moyen du sérum 83, qu'on savait dépourvu de tout anticorps anti-albumine. AP3 contenait 5 p. 100 d'haptoglobine selon la première méthode de comparaison, et 5,8 p. 100 selon la deuxième méthode. La concordance des valeurs était plus que suffisante pour rendre vraisemblable la conclusion suivante : les animaux tolérants avaient fabriqué un anticorps anti-haptoglobine. Comme le pourcentage d'haptoglobine présente est assez bas, il se peut que la troisième phase d'élimination, survenant après la troisième série d'immunisations et observée chez trois chèvres traitées à la naissance, représente la suppression de la circulation de l'albumine humaine et non celle d'une impureté macromoléculaire.

Nos expériences [49] ont donc montré que la tolérance à l'albumine humaine peut être induite chez des chèvres par injection de l'antigène dès leur naissance. Une impureté antigénique dans la préparation d'albumine utilisée n'induisit pas la tolérance, mais provoqua la formation d'anticorps après injection chez l'animal adulte. En conséquence, un anticorps pouvait être décelé chez des animaux tolérants à l'albumine humaine et même trouvé en

circulation en même temps que l'antigène. L'anticorps présent était dirigé contre un antigène autre que celui en circulation, ce qui indiqua la présence et l'effet d'une impureté antigénique, qui fut finalement identifiée comme étant l'haptoglobine.

*Effet de l'hétérogénéité de l'antigène
sur la mise en évidence de la tolérance.*

Peu de préparations de protéines purifiées peuvent se rencontrer qui soient libres de contaminants antigéniques [41, 49] ; la situation qui vient d'être exposée pourrait donc se rencontrer chez d'autres animaux avec d'autres protéines purifiées comme antigènes. Plus le pourcentage de l'impureté antigénique est bas, plus faible est la probabilité que la quantité de protéine injectée aux animaux dès leur naissance contienne assez d'impureté pour induire la tolérance à l'égard de cette impureté et, dans ce cas, plus grande devient la probabilité que cette impureté provoque une réponse en anticorps après une immunisation prolongée de l'animal adulte. Comme on le voit, l'apparition d'anticorps, après l'immunisation prolongée d'un animal adulte qui a été traité à la naissance, ne peut pas nécessairement être considérée comme une preuve que la tolérance a été restreinte. Une telle conclusion doit être basée sur une démonstration que l'anticorps est dirigé contre les principaux constituants antigéniques envers lesquels la tolérance avait été initialement établie. Le problème est même plus complexe lorsque des cellules sont utilisées comme antigènes. Ici, l'agent à l'égard duquel et au moyen duquel la tolérance est induite et vérifiée, consiste en un nombre très grand d'antigènes variés, chacun agissant indépendamment pour induire la tolérance, et chacun étant présent en quantité distincte.

Dans le cas où des cellules homologues sont injectées, qui peuvent se multiplier chez le receveur, il se peut que chaque antigène devienne présent en quantité suffisante pour induire la tolérance. S'il s'agit de cellules hétérologues et incapables de se multiplier chez le receveur, le problème peut être tout autre. Les antigènes qui existent à très faible concentration à la surface de ces cellules n'induiront pas la tolérance, alors que ceux qui sont plus abondants le feront. Une immunisation ultérieure conduira alors à la formation d'anticorps vis-à-vis des antigènes rares seulement. On en viendrait alors à la conclusion que la tolérance n'existe pas, ce qui est correct du point de vue de la physiologie cellulaire, mais non de l'immunologie. Cependant, ces anticorps seraient susceptibles de réagir avec la cellule d'une manière très différente de celle des anticorps des animaux qui ont été immunisés sans avoir été traités à la naissance avec la cellule. En

effet, dans ce dernier cas, les anticorps seraient dirigés à la fois contre les antigènes abondants et contre les antigènes rares, et l'action sur les antigènes rares pourrait être masquée par l'effet sur les antigènes abondants. En conséquence, tout se passerait comme si la constante de dissociation ou la valence de l'anticorps avait été affectée par une injection à la naissance. Cependant, la dissociation de l'anticorps peut ne pas avoir changé, alors que la distribution des spécificités a été modifiée. En d'autres termes, les anticorps des animaux ayant reçu des inoculations à la naissance réagiraient seulement avec quelques zones sur la cellule, alors que ceux des animaux non traités pourraient s'unir avec un plus grand nombre d'antigènes et, en particulier, avec les antigènes plus abondants à la surface de la cellule.

A la lumière des expériences décrites, on peut conclure qu'à moins de s'en tenir à des critères très rigides pour démontrer que des animaux immunisés à la naissance n'ont pas produit d'anticorps envers l'antigène principal injecté, les rapports négatifs d'une part, c'est-à-dire les échecs à induire la tolérance, doivent être acceptés sous réserve et, d'autre part, l'obtention d'une induction de la tolérance envers des protéines définies peut être considérée comme une indication que la tolérance immunologique est un phénomène général.

Le grand soin que nous avons pris à analyser cette source d'erreur en particulier s'explique. En effet, la question d'universalité de la tolérance immunologique acquise envers les protéines hétérologues s'appuie sur ces considérations et doit être minutieusement examinée afin que soit justifiée l'extrapolation aux protéines autologues à partir de la démonstration expérimentale de la tolérance vis-à-vis des antigènes hétérologues.

SPECIFICITÉ DE LA TOLÉRANCE IMMUNOLOGIQUE ACQUISE ENVERS DES ANTIGÈNES DÉFINIS.

Nous allons maintenant aborder la seconde question soulevée au début, celle de la spécificité de la tolérance immunologique acquise. Pour étudier ce problème nous avons fait, en collaboration avec Dubert et Pearce, des expériences types dans les conditions suivantes [8, 10] (tableau II).

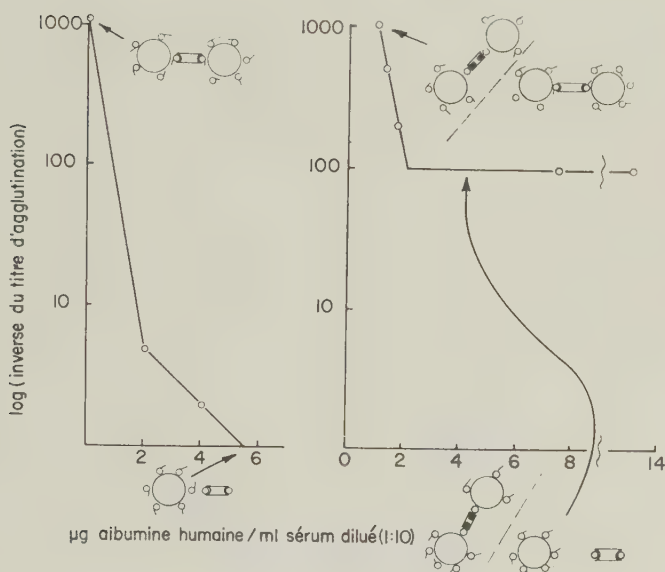
TABLEAU II.

ANTIGÈNE INJECTÉ A LA NAISSANCE	ANTIGÈNE INJECTÉ DURANT LA VIE ADULTE
albumine humaine azoribonucléase azosérum de lapin	azoalbumine humaine azoalbumine humaine azoalbumine humaine

Notre système d'examen des anticorps a été basé sur l'inhibition de l'agglutination. Voici, une fois de plus, en résumé, comment

Sérum anti-albumine humaine
(peut être complètement
inhibé par addition préalable
d'albumine humaine).

Sérum anti-azoalbumine humaine (ne
peut pas être complètement inhibé
par addition préalable d'albumine
humaine).



- ▬ Anticorps envers l'albumine humaine naturelle.
- ▬ Anticorps envers une modification structurale chez l'albumine humaine devenue azoalbumine humaine.
- Albumine humaine naturelle.
- ◌ Azoalbumine humaine.

FIG. 3. — Inhibition de l'agglutination comme moyen de détection de l'hétérogénéité hapténique dans la spécificité de l'anticorps. Inhibition, par l'albumine humaine, de l'agglutination des globules rouges tannés et sensibilisés par l'azoalbumine humaine. Les symboles ci-dessus sont employés dans le graphique pour montrer les réactions se passant en excès d'antigène et excès d'anticorps.

cette méthode a été employée [9, 10, 11]. L'anticorps anti-albumine peut agglutiner des globules rouges tannés et sensibilisés par l'albumine humaine. On réduit le pouvoir agglutinant du sérum

si l'on y ajoute de l'albumine humaine avant de le mettre en contact avec les globules rouges sensibilisés. La baisse du pouvoir agglutinant dépend des quantités d'anticorps et d'antigènes présents. Si l'antigène est ajouté en quantité équivalente, il y aura inhibition complète de l'agglutination, alors que des quantités plus faibles conduiront à des agglutinations partielles. On peut représenter graphiquement les résultats de telles expériences par le logarithme de l'inverse du titre en fonction de la quantité d'antigène ajoutée avant l'agglutination. La capacité d'agglutination d'un anticorps anti-azoalbumine humaine envers des hématies sensibilisées par l'azoalbumine humaine serait, par exemple, complètement inhibée par l'azoalbumine humaine, mais incomplètement par l'albumine humaine, parce qu'il y aurait toujours une certaine quantité d'anticorps engendrés par la fraction structurale altérée de l'albumine et que ces anticorps ne seraient pas affectés par l'addition de la protéine naturelle (fig. 3).

L'anticorps évalué au cours de ces expériences n'est pas nécessairement identique à celui mesuré par une dialyse d'équilibre contre des haptènes. D'après la détermination au moyen de la dialyse d'équilibre, l'anticorps contre l'haptène ne se rencontre pas dans le sérum de tous les animaux après une troisième série d'injections. Selon la technique décrite ici, cette sorte d'anticorps fut trouvée chez chacun des animaux témoins (fig. 5 A). En attendant de trouver une explication à cette discordance, nous préférons dire « anticorps dirigé contre la modification structurale de la molécule » plutôt que « anticorps dirigé contre le groupe azo ». Nous insistons cependant sur le fait que la décision finale sur ce point en particulier n'affectera d'aucune façon la nature des considérations suivantes.

Dans la plupart des cas, l'immunisation par l'azoalbumine humaine d'animaux tolérants envers l'albumine humaine ne suscite pas une réponse perceptible en anticorps vis-à-vis de l'azoalbumine humaine. Toutefois, 20 à 30 p. 100 des animaux tolérants à l'albumine humaine élaboreront un anticorps anti-azoalbumine humaine. Cet anticorps n'est pas inhibé par l'addition préalable d'albumine humaine au sérum, mais, par contre, il est neutralisé complètement par l'azoalbumine humaine (fig. 4). De tels anticorps sont donc entièrement dirigés contre la section modifiée de la molécule et non contre sa partie inchangée. Les animaux ayant reçu à la naissance des inoculations d'azoribonucléase et immunisés ultérieurement avec de l'azoalbumine humaine montrent aussi deux réponses différentes. La majorité des animaux élaborent des anticorps à la fois contre la partie intacte et contre la structure altérée de la molécule, alors qu'un petit nombre d'entre eux produiront des anticorps dirigés exclusi-

vement contre la partie intacte de la molécule sans qu'aucun le soit contre sa modification structurale (fig. 5 A et 5 B).

On rencontre cependant un cas expérimental en contradiction avec l'hypothèse des déterminants individuels considérés comme les agents exclusifs de l'induction de la tolérance. Les animaux traités à la naissance par de l'azosérum de lapin et immunisés ensuite avec de l'azoalbumine humaine forment des anticorps à la fois contre la fraction modifiée et la partie inchangée de la molécule, et les anticorps de ces animaux ne peuvent en aucune

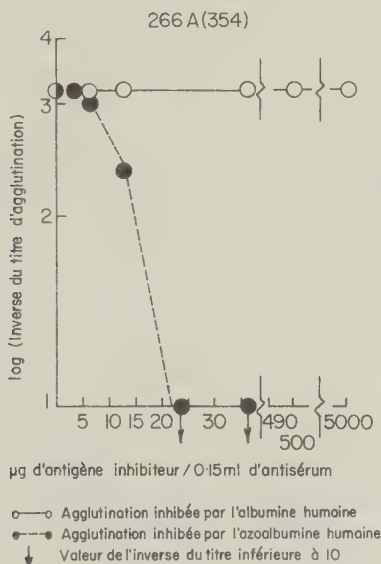


FIG. 4. — Spécificité des sérums de lapins traités à la naissance par l'albumine humaine et immunisés à l'état adulte par l'azoalbumine humaine. Inhibition par l'albumine humaine et l'azoalbumine humaine de l'agglutination de globules rouges tannés et sensibilisés par l'azoalbumine humaine. Sérum de lapin anti-azoalbumine humaine. Lapin traité à la naissance par l'albumine humaine et immunisé ultérieurement par l'azoalbumine humaine.

façon se distinguer de ceux produits par les autres animaux de la même portée, traités de la même façon, sauf le cas de l'inoculation à la naissance.

Il n'est pas possible présentement de savoir si cette observation est d'une importance fondamentale ou si elle est due à des circonstances périphériques spéciales. Pour le moment, certaines réserves doivent être faites pour tenir compte de ce fait et aussi de la découverte que la tolérance semble inhiber, chez beaucoup d'animaux ayant reçu à la naissance des inoculations de la

molécule naturelle seule, la réponse en anticorps envers la modification structurale de la molécule. A l'exception de cette dernière expérience, tout semble bien indiquer que la tolérance est dépendante des déterminants antigéniques. En conséquence, la réponse en anticorps d'un animal adulte tolérant n'est pas seulement

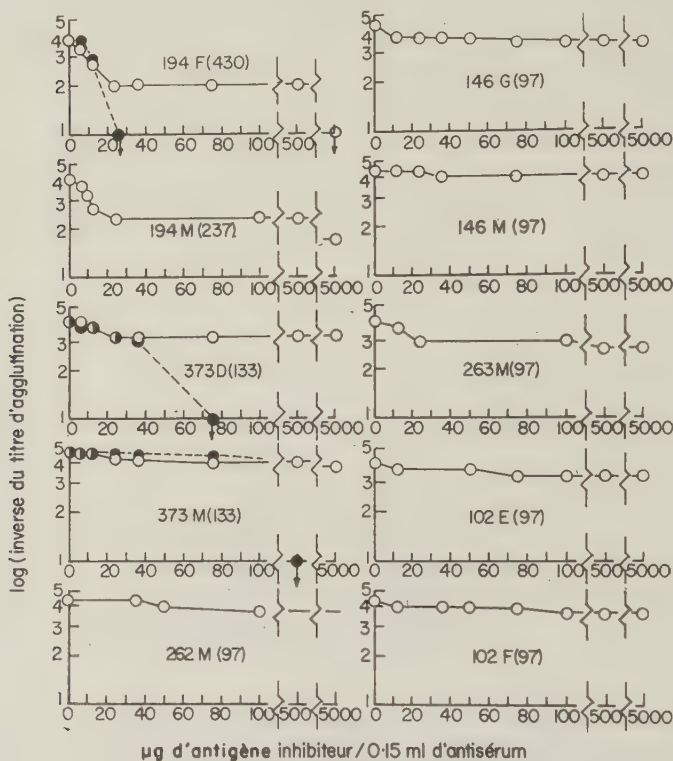


FIG. 5 a. — Spécificité des sérums de lapins non traités à la naissance mais immunisés durant la vie adulte par l'azoalbumine humaine. *Témoins.* Inhibition par albumine humaine et azoalbumine humaine de l'agglutination de globules rouges tannés et sensibilisés par l'azoalbumine humaine. Sérums anti-azoalbumine humaine obtenus d'animaux adultes normaux, non traités par l'azoalbumine humaine à la naissance, et des lapins 102E et 102F ayant reçu une seule injection de 5 mg d'azoalbumine humaine à la naissance (cette dose n'affecte pas la réponse ultérieure). Les chiffres entre parenthèses donnent l'âge de l'animal donneur, excepté dans le cas des femelles, où le nombre entre parenthèses indique le nombre de jours après la mise bas.

inhibée par rapport à l'antigène injecté à la naissance, mais est aussi réduite pour un antigène inoculé durant la vie adulte, antigène qui posséderait certains déterminants communs avec le matériel injecté à la naissance. Ceci explique l'observation [4] que les lapins tolérants envers l'albumine bovine produisent de façon significative moins d'anticorps envers l'albumine d'œuf (connue comme donnant une réaction croisée avec l'albumine bovine [24]) que ne le font les animaux non tolérants envers l'albumine bovine.

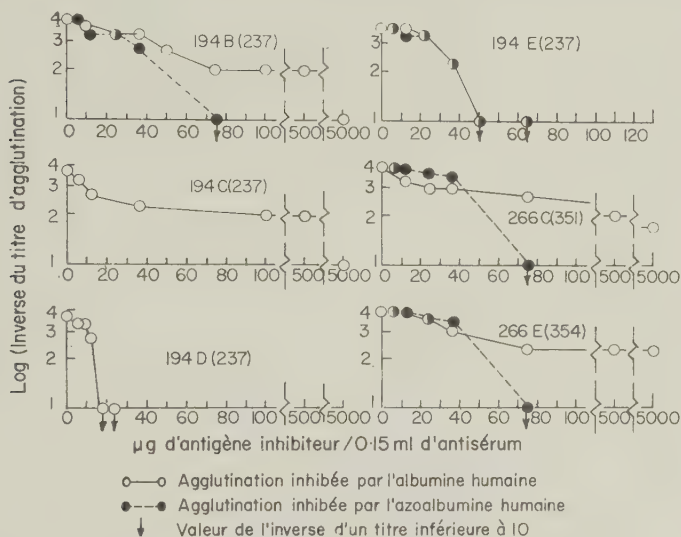


FIG. 5 b. — Spécificité des sérums de lapins traités à la naissance par l'azoriboncléase et immunisés durant la vie adulte par l'azoalbumine humaine. Lapins traités à la naissance par l'azoriboncléase. Inhibition par l'albumine humaine et l'azoalbumine humaine de l'agglutination de globules rouges tannés et sensibilisés par l'azoalbumine humaine. Sérum anti-azoalbumine humaine obtenu d'animaux adultes traités à la naissance par l'azoriboncléase. Les chiffres entre parenthèses indiquent l'âge de l'animal donneur.

On pourrait résumer ainsi les observations précédentes (fig. 6) : la tolérance immunologique acquise, comme la réponse immunologique, peut donc être induite envers des groupements d'une molécule et ne dépend pas exclusivement de la molécule considérée comme entité. Toutefois, la molécule comme entité semble jouer un rôle dans la détermination de la spécificité de la tolérance immunologique acquise. Cette affirmation est basée sur le fait que quelques animaux tolérants à l'albumine humaine semblent incapables de former des anticorps à l'égard de la fraction moléculaire altérée par le couplage, cependant que tous les ani-

maux traités à la naissance avec de l'azosérum de lapin paraissent capables de donner des anticorps envers la modification structurale apportée par l'introduction du groupement azo, même rattaché à l'albumine humaine. Il reste bien des détails à éclaircir sur ce point, car, en vérité, nous en sommes encore au début dans l'analyse de la spécificité.

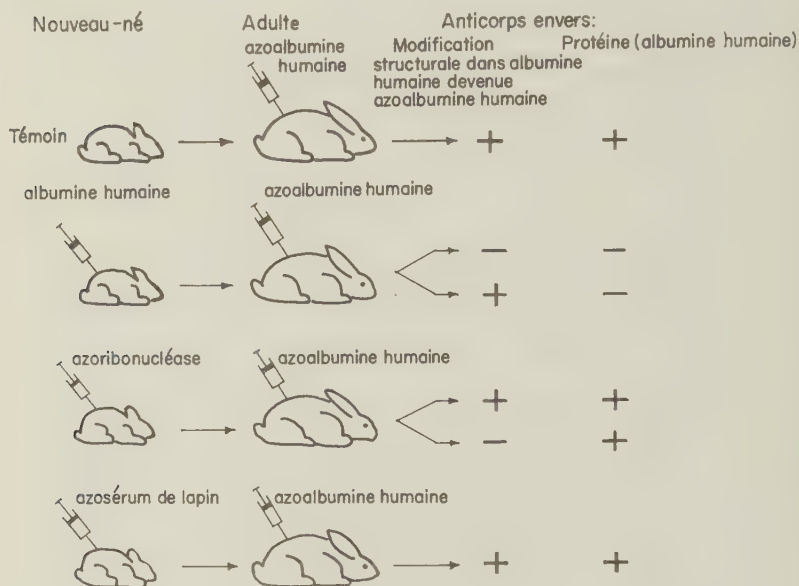


FIG. 6. — Spécificité de la tolérance immunologique acquise. Résumé des expériences modèles.

SPÉCIFICITÉ DE LA RÉPONSE EN ANTICORPS.

Des expériences modèles avec des protéines naturelles ou modifiées ont montré qu'un animal tolérant à l'albumine humaine peut former de faibles quantités d'anticorps anti-azoalbumine humaine. Ces anticorps diffèrent de ceux qui sont formés par un animal non traité à la naissance, car ils sont presque exclusivement adaptés à la structure modifiée de la molécule, ne montrant que très peu de réaction croisée avec la partie intacte de la protéine. La tolérance envers un antigène hétérologue peut donc affecter la réponse en anticorps envers un autre antigène si un motif antigénique est commun aux deux antigènes. Si l'on admet un effet similaire comme résultat de la tolérance à une protéine autologue,

un animal adulte pourrait non seulement être empêché de faire des anticorps vis-à-vis de la protéine autologue comme telle, mais aussi envers tout motif antigénique présent chez une protéine autologue. Une protéine hétérologue qui contiendrait un groupement déterminant similaire ou semblable serait alors incapable d'agir comme inducteur de la production d'anticorps.

Comme une grande variété de protéines circulent dans l'organisme, il semblerait admissible qu'un nombre considérable de motifs antigéniques fussent exclus en ce qui concerne l'induction d'anticorps ; il en résulte que la spécificité de la réponse en anticorps envers les protéines serait contrôlée dans beaucoup de cas par la tolérance développée envers les protéines autologues. De plus, la quantité d'anticorps synthétisés en réponse à un antigène hétérologue serait subordonnée ainsi à la tolérance induite envers les protéines autologues, car le nombre de motifs antigéniques potentiels d'un antigène hétérologue dépendrait du nombre de groupements déterminants, distincts de ceux des protéines autologues du sujet à immuniser.

Les études sur les anticorps anti-enzymes [51] ont apporté une confirmation expérimentale à l'effet supposé des déterminants autologues sur la réponse envers des antigènes hétérologues. Alors que la structure des apoenzymes varie d'une espèce à l'autre, les groupes prosthétiques des enzymes sont peu affectés au cours de l'évolution. On peut susciter des anticorps anti-apoenzymes aussi facilement qu'envers n'importe quel antigène protéique. Jusqu'ici, on n'a pu mettre en évidence un anticorps dirigé contre le groupe prosthétique ; les nombreux travaux sur l'hémoglobine, par exemple, n'ont pas révélé d'anticorps spécifique à la portion hème.

HÉRÉDITÉ DE LA RÉPONSE EN ANTICORPS.

Déterminisme génétique de la structure des protéines.

L'influence possible de la tolérance envers les protéines autologues sur le contrôle génétique de la réponse en anticorps est peut-être la plus intéressante des conséquences probables de la tolérance à l'égard des protéines isologues. Les gènes agiraient ainsi de façon indirecte.

Dans le système type déjà mentionné [8, 9, 10], l'azalbumine, normalement un bon antigène, était devenu un piètre antigène pour les animaux tolérants à l'albumine humaine. La tolérance naturelle envers une protéine autologue pourrait, on le présume, agir à la façon de la tolérance induite expérimentalement vis-à-vis des protéines hétérologues, dont le mode d'action vient d'être

montré. Il suffit alors de supposer que l'hérédité de la réponse en anticorps intervient au moyen de la structure des protéines autologues, comme une conséquence de la tolérance immunologique aux protéines autologues, et il n'est pas nécessaire de faire appel à un contrôle génétique direct et indépendant pour la réponse en anticorps envers tous les antigènes (tableau III).

TABLEAU III. — Variation génétique des protéines du sang.

PROTÉINE	ESPÈCE	AUTEUR	PUBLICATION
Globuline	Lapin	Oudin	1956 <i>C. R. Acad. Sci.</i> , 242, 2489-2490
		Oudin	1956 <i>C. R. Acad. Sci.</i> , 242, 2606-2608
	Cobaye	Oudin	1958 In : <i>Symposium on Protein Structure</i> , 298-301 A. Neuberger, John Wiley, edit. New York
	Bétail	Ashton	1957 <i>Nature</i> , 180 , 917-919
	Homme	Grubb et Laurell	1956 <i>Acta Pathol. Microbiol. Scand.</i> , 39 , 390
Hémoglobine	Homme	Itano	1957 <i>Advances in Protein Chem.</i> , 12 , 215-268
	Bétail	Bangham	1957 <i>Nature</i> , 179 , 467-468
		Harris, <i>et al</i>	1955 <i>Biochem. J.</i> , 60 , XXIX
		Mouton	Cabannes, <i>et al</i>
		Huisman, <i>et al</i>	1958 <i>Nature</i> , 182 , 171-172
		van der Helm, <i>et al</i>	1957 <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 72 , 331-339
Haptoglobine	Homme	Smithies, <i>et al</i>	1956 <i>Nature</i> , 178 , 694-695
		Sutton, <i>et al</i>	1956 <i>Nature</i> , 178 , 1287
		Bearn, <i>et al</i>	1959 <i>J. Exp. Med.</i> , 109 , 55-68
Albumine ..	Homme	Knedel	1957 <i>Blut.</i> , 3 , 129
		Knedel	1958 <i>Clin. Chim. Acta</i> , 3 , 71
		Earle, <i>et al</i>	1959 <i>J. Clin. Invest.</i> , 38 , 1412-1420

La quantité d'anticorps synthétisés dépendrait, entre autres facteurs, du nombre de groupements déterminants d'un antigène capables de provoquer l'apparition d'anticorps, c'est-à-dire du nombre de motifs antigéniques non exclus par la tolérance aux protéines autologues. Les motifs antigéniques exclus comme immunogènes seraient sous contrôle génétique dans la mesure où les séquences d'acides aminés et les structures des protéines autologues le sont. Par conséquent, les différences entre les réponses de divers individus seraient attribuables à des variations

dans la structure de leurs protéines. On sait que les globulines sériques chez le lapin [25, 26, 27], le cobaye [28], le bétail [29] et l'homme [30]; l'hémoglobine chez l'homme [31], le bétail [32] et le mouton [33, 36]; l'haptoglobine [37, 38, 39] et l'albumine [40, 41, 42] chez l'homme, sont sous un contrôle génétique individuel et varient selon les différents individus. Il est probable qu'on trouvera cette même situation pour d'autres, sinon toutes les protéines. Même si ces différences ne peuvent affecter qu'une très petite proportion des acides aminés [43, 44] elles peuvent cependant exercer un effet profond sur la structure tertiaire des protéines. Ainsi, selon les individus, il n'y aurait pas de réponse en anticorps envers diverses séquences d'acides aminés. Comme conséquence de cette variation génétique entre déterminants, les motifs antigéniques exclus comme immunogènes varieraient d'un individu à l'autre et un antigène hétérologue pourrait avoir beaucoup plus de structures capables de susciter la formation d'anticorps chez un individu que chez un autre. Il en résulterait des différences dans la quantité d'anticorps produits par divers sujets immunisés par le même antigène hétérologue et ce phénomène serait héréditaire.

Si les spéculations précédentes sont correctes et si une maladie par auto-immunisation peut même se produire comme conséquence d'une certaine disparition de la tolérance, ce phénomène devrait être accompagné d'un changement, si petit soit-il, dans la spécificité et la nature de la réponse entière en anticorps. Ce fait pourrait permettre une distinction expérimentale entre une maladie par auto-immunisation causée par la mise à jour d'un antigène normalement inaccessible, envers lequel la tolérance n'avait jamais été établie, et une maladie par auto-immunisation résultant d'une restriction subite dans la tolérance antérieurement acquise.

Preuves actuelles

en faveur de l'hérédité de la réponse en anticorps.

Il y a des faits qui suggèrent, sinon démontrent l'hérédité des variations dans la réponse en anticorps. Du point de vue immuno-chimique, une analyse démonstrative devra être faite à l'aide d'antigènes homogènes et moléculairement définis. Il est possible d'employer un mélange d'antigènes si une espèce moléculaire particulière peut être identifiée par son action biochimique de telle sorte que la réponse en anticorps soit mesurable au moyen de l'inhibition de l'activité biologique ou biochimique de l'antigène.

Gorer et Schütze [45] ont montré que la quantité d'anticorps élaborés à la suite d'une immunisation par les antigènes H et O de *S. typhimurium* et *S. enteritidis* est différente pour les animaux

d'une race à l'autre et que la quantité respective d'anticorps formés par chacune des lignées n'est pas la même envers l'un et l'autre antigène. Des observations similaires ont été rapportées par Ipsen [46, 47] au sujet de la production d'anticorps par des races consanguines de souris contre l'anatoxine tétanique. : la réponse moyenne variait pour chaque lignée de souris et la quantité respective d'anticorps élaborés après des immunisations primaire et secondaire demeurait la même. Scheibel [48] a pu obtenir par croisements consanguins deux lignées de cobayes différant par leur capacité de production d'antitoxine diphtérique. Ses découvertes sont probablement les plus détaillées disponibles aujourd'hui et, tout en fournissant une preuve solide en faveur de l'hérédité de la réponse en anticorps, elles ont aussi révélé un certain nombre de phénomènes difficiles à comprendre. Chez la bonne race de cobayes, qui fournissait une grande quantité d'anticorps, il y avait une élévation significative de la quantité formée par les descendants de la troisième génération ; la variation n'était toutefois pas significative chez les deux générations suivantes et il y avait une baisse nette dans la production d'antitoxine chez la sixième génération. Aucune explication ne peut être fournie pour cette chute. D'autre part, le nombre d'animaux dans la mauvaise lignée, chez lesquels aucun anticorps n'était mesurable, s'accroissait de génération en génération. La quantité d'antitoxine décelable chez les mauvais sujets ne changea pas au cours de la sélection et des croisements consanguins. Il y avait une différence nette entre les générations correspondantes des bonnes et mauvaises lignées après la génération F_1 . Cependant, les races n'étaient pas suffisamment pures pour des expériences de croisement et le mode d'hérédité ne fut donc pas analysé. Le fait qu'en une génération, chez la bonne race, le nombre de producteurs d'antitoxine dépassait 90 p. 100 alors qu'il fallait cinq générations de la mauvaise lignée pour donner 90 p. 100 de producteurs, conduisit Scheibel à suggérer la dominance de la faculté de fabriquer l'antitoxine.

Sobey [49] a obtenu des résultats très suggestifs concernant l'hérédité des réponses en anticorps. Il a pu mesurer l'héritabilité de la réaction du lapin au virus de la mosaïque du tabac en déterminant la quantité d'anticorps présente chez les parents et leurs descendants lors de la réponse secondaire envers cet antigène. La régression entre les valeurs moyennes trouvées chez les parents et celles trouvées chez les descendants dans une population non consanguine de lapins conduisit à une héritabilité de $h^2 = 0,876$ avec une S. E. = 0,09.

Il y a donc une certaine présomption en faveur de l'hérédité de la réaction en anticorps. Selon le mécanisme proposé au cours de cette conférence, on devrait s'attendre à trouver comme mul-

tifactorielle l'hérédité de la réponse en anticorps. Toutefois, on a besoin ici, d'une démonstration définitive sur ce point.

Les expériences de Gorer et Schütze [45] ont indiqué que la réaction en anticorps à l'égard de différents antigènes pouvait se transmettre par hérédité de façon indépendante (voir aussi [50]). Ce fait est aussi indiqué par une observation récente au sujet d'antigènes purifiés. La ribonucléase bovine, qui est un excellent antigène chez des lapins de garenne, n'a pratiquement suscité aucun anticorps en quantité mesurable chez des lapins de la variété Blanc d'Himalaya [42]. Cependant, d'autres antigènes, par exemple l'albumine humaine ou l'azalbumine humaine, provoquent des anticorps à un haut titre chez ces deux types de lapins.

Les expériences génétiques actuellement disponibles permettent de prédire que l'intensité de la réponse en anticorps envers un antigène donné est un caractère héritable et aussi que la capacité à former des anticorps à l'égard de divers antigènes peut être héritée indépendamment.

CONCLUSION.

Appuyée par les faits et déductions mentionnés plus haut, l'hypothèse est émise que la fabrication des anticorps envers des antigènes hétérologues est contrôlée dans sa spécificité et son hérédité par la tolérance à l'égard des protéines autologues. Chaque synthèse d'anticorps correspondant à un antigène hétérologue donné serait due à un caractère hérité de façon indépendante, et ce, dans la mesure où il y a transmission héréditaire indépendante pour la structure des protéines autologues. L'élaboration d'anticorps à l'égard de la plupart des antigènes dépendrait donc de la présence des structures spécifiques autologues, l'hérédité de la production d'anticorps contre la plupart des antigènes étant multifactorielle. L'expérience acquise dans les domaines concernant la spécificité des anticorps anti-enzymes et l'hérédité de la réponse en anticorps est en accord avec cette hypothèse.

SUMMARY

AN IMMUNOLOGICAL STEERING MECHANISM

An immunological steering mechanism has been proposed which would contribute to the specificity of the antibody response and cause the inheritance of the extent of antibody response. It is suggested that animals are tolerant to their own circulating antigens and hence to a very large number of antigenic determinants. An antigenic determinant of an heterologous protein

could only induce an antibody response if it were different from any of the determinants of the autologous proteins (fig. 6). The specificity of the antibody response would thus depend on the relation between the structure of autologous and heterologous antigens. The structure of autologous proteins could also control the inheritance of the antibody response. The determinant sites of autologous proteins are not always the same in individuals of the same species (table III), and as a consequence the determinants of a heterologous protein which could elicit an antibody response would not be necessarily identical, in composition or number, in two individuals of the same species. Since the structure and sequence of amino acids of autologous proteins is genetically controlled, the antibody response, which would depend on these, would also be inherited and would be inherited independently for different antigens. Since the antibody response to most antigens would depend on several autologous antigens, the inheritance of the antibody response to most antigens would be multifactorial.

The premises of this hypothesis and the existing evidence as to its consequences have been examined. The available evidence on the inheritance of the antibody response is in agreement with the hypothesis.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BILLINGHAM (R. E.), BRENT (L.) et MEDAWAR (P. B.). *Nature*, 1953, **172**, 603.
- [2] BILLINGHAM (R. E.), BRENT (L.) et MEDAWAR (P. B.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1955, **59**, 409.
- [3] BILLINGHAM (R. E.), BRENT (L.) et MEDAWAR (P. B.). *Phil. Trans. B.*, 1956 a, **239**, 357.
- [4] HANAN (R.) et OYAMA (J.). *J. Immunol.*, 1954, **73**, 49.
- [5] KERR (W. R.) et ROBERTSON (M.). *J. Hyg.*, 1954, **52**, 253.
- [6] KERR (W. R.) et ROBERTSON (M.). *J. Hyg.*, 1956, **54**, 415.
- [7] DIXON (F. J.) et MAURER (P. H.). *J. exp. Med.*, 1955, **101**, 215.
- [8] CINADER (B.) et DUBERT (J. M.). *Brit. J. exp. Path.*, 1955, **36**, 515.
- [9] CINADER (B.) et DUBERT (J. M.). *Proc. Roy. Soc. B.*, 1956, **146**, 18.
- [10] CINADER (B.) et PEARCE (J. H.). *Brit. J. exp. Path.*, 1958, **39**, 8.
- [11] CINADER (B.) et PEARCE (J. H.). *Brit. J. exp. Path.*, 1956, **37**, 541.
- [12] CINADER (B.), PEARCE (J. H.) et CARTER (B. G.). *Nature*, 1958, **181**, 1208.
- [13] WOLFE (H. R.), TEMPELIS (C.), MUELLER (A.) et REIBEL (S.). *J. Immunol.*, 1957, **79**, 147.
- [14] SMITH (R. T.) et BRIDGES (R. A.). *J. exp. Med.*, 1958, **108**, 227.
- [15] SMITH (R. T.). *Feder. Proc.*, 1958, **17**, 535 ; « Mechanism of Antibody Formation », *Proc. Symposium, Inst. Biology, Czechoslovak Acad. Sci.*, 1959, Prague, 1960, **6 a**, 313.

- [16] TERRES (G.) et HUGHES (W. L.). *J. Immunol.*, 1959, **83**, 459.
- [17] CHASE (M. W.). *Ann. Rev. Microbiol.*, 1959, **13**, 349.
- [18] BUSSARD (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **245**, 2430 ; « Mechanism of Antibody Formation », *Proc. Symposium, Inst. Biology, Czechoslovak Acad. Sci.*, 1959, Prague, 1960, **6 a**, 329.
- [19] CARTER (B. G.) et CINADER (B.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, **87**, 352.
- [20] MITCHISON (N.). In « Biological Problems of Grafting », *Colloquium International, University of Liege*, 1959, 239.
- [21] DUBERT (J. M.) et PARAF (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 686.
- [22] LEDERBERG (J.). *Science*, 1959, **129**, 1649.
- [23] HIRATA (A. A.), GARVEY (J. S.) et CAMPBELL (D. H.). *J. Immunol.*, 1960, **84**, 576.
- [24] MAURER (P.). *J. Immunol.*, 1954, **72**, 119.
- [25] OUDIN (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 2489.
- [26] OUDIN (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 2606.
- [27] DRAY (S.) et YOUNG (G. O.). *Science*, 1960, **131**, 738.
- [28] OUDIN (J.). In *Symposium on Protein Structure*, A. Neuberger, édit. John Wiley, New York, 1958, 298.
- [29] ASHTON (G. C.). *Nature*, 1957, **180**, 917.
- [30] GRUBB (R.) et LAURELL (A. B.). *Acta pathol. microb. scand.*, 1956, **39**, 390.
- [31] ITANO (H. A.). *Adv. Protein Chem.*, 1957, **12**, 215.
- [32] BANGHAM (A. D.). *Nature*, 1957, **179**, 467.
- [33] HARRIS (H.) et WARREN (F. L.). *Biochem. J.*, 1955, **60**, 29.
- [34] CABANNES (R.) et SERAIN (C. L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 1193.
- [35] HUISMAN (T. H. J.), VAN VLIET (G.) et SEBENS (T.). *Nature*, 1958, **182**, 171.
- [36] VAN DER HELM (H. J.), VAN VLIET (G.) et HUISMAN (T. H. J.). *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, **72**, 331.
- [37] SMITHIES (O.) et WALKER (N. F.). *Nature*, 1956, **178**, 694.
- [38] SUTTON (H. E.), NEEL (J. V.), BINSON (G.) et ZUELZER (W. W.). *Nature*, 1956, **178**, 1287.
- [39] BEARN (A. G.) et FRANKLIN (E. C.). *J. exp. Med.*, 1959, **109**, 55.
- [40] KNEDEL (M.). *Blut*, 1957, **3**, 129.
- [41] KNEDEL (M.). *Clin. Chim. Acta*, 1958, **3**, 71.
- [42] EARLE (D. P.), HUTT (M. P.), SCHMID (K.) et GITLIN (D.). *J. Clin. Invest.*, 1959, **38**, 1412.
- [43] VAUGHAN (M.) et STEINBERG (D.). *Adv. Protein. Chem.*, 1959, **14**, 115.
- [44] ANFENSEN (C. B.). *The molecular basis of evolution*, John Wiley, New York, 1959.
- [45] GORER (P. A.) et SCHÜTZE (H.). *J. Hyg.*, 1938, **38**, 647.
- [46] IPSEN (J.). *J. Immunol.*, 1954, **72**, 243.
- [47] IPSEN (J.). *J. Immunol.*, 1959, **83**, 448.
- [48] SCHEIBEL (I. F.). *Acta. pathol. microb. scand.*, 1943, **20**, 464.
- [49] SOBEY (W. R.). *Australian J. biol. Sci.*, 1954, **7**, 111.
- [50] FINK (M. A.) et QUINN (V. A.). *J. Immunol.*, 1953, **70**, 61.
- [51] CINADER (B.). *Immunochemistry, Biochem. Society Sympos.*, n° 10, Cambridge University Press, Cambridge, 1953, 16 ; *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, **37**, 761 ; *Ann. Rev. Microbiol.*, 1957, **11**, 371.

**VIRULENCE COMPARÉE
POUR LES VERS A SOIE (BOMBYX MORI L.)
DE QUELQUES VARIÉTÉS
DE BACILLUS CEREUS FRANK. ET FRANK.
ENTOMOPHAGES ET CRISTALLOPHORES
ET DE LEURS INCLUSIONS CRISTALLINES**

par C. TOUMANOFF et J. DURAND (*) (**)

(Institut Pasteur)

Les recherches concernant l'effet des bactéries aérobies du groupe *cereus* sont déjà nombreuses et des éléments utiles ont été réunis à ce point de vue au cours des dernières années.

C'est ainsi que les travaux qui ont été publiés sur ce sujet et qui se rapportent à des bactéries aérobies sporogènes du groupe *cereus* déjà bien connues et notamment : *B. cereus* var. *thuringiensis* (souche Mattes d'Allemagne, isolée d'*Ephestia kuhniella*, largement distribuée dans les laboratoires d'Europe et d'Amérique), *B. cereus* var. *sotto* agent pathogène de la flacherie des vers à soie au Japon, et *B. cereus* var. *alesti* isolé des vers à soie de la région des Cévennes, ont démontré qu'il existe une certaine spécificité en ce qui concerne leur action sur les chenilles de *Bombyx mori* et d'autres Lépidoptères.

En ce qui concerne les vers à soie, ce sont *B. cereus* var. *alesti* et *B. cereus* var. *sotto* qui s'avèrent les plus pathogènes pour les vers, suivis par *B. cereus* var. *thuringiensis* souche Mattes, qui est la moins pathogène de toutes, on peut même dire peu pathogène pour les vers à soie.

Néanmoins, comme l'ont démontré les expériences effectuées par l'un de nous, *B. cereus* var. *alesti* est pathogène non seulement pour les vers à soie mais également pour d'autres larves de Lépidoptères et plus spécialement pour *Hyponomeuta cognata*.

(*) Directeur de recherches à l'O. R. S. T. O. M.

(**) Société Française de Microbiologie, séance du 3 novembre 1960.

tella, *H. malinella*, *Pieris brassicae* et, dans une bien plus faible mesure, pour les chenilles de la fausse teigne des ruches, *Gal-leria mellonella* [10].

Il est ainsi apparu que la variété *alesti* qui a été isolée d'un insecte phytophage (*Bombyx mori* L.) est une souche polyvalente dont l'utilisation dans la lutte contre les larves de Lépidoptères nuisibles pourrait présenter un intérêt tout à fait spécial [12].

Il fut par contre noté, aussi bien en France qu'au Canada, que *B. cereus* var. *thuringiensis* (souche Mattes) n'est que peu ou pas pathogène pour les chenilles de la fausse teigne, *Gal-leria mellonella*.

Il a été signalé par ailleurs qu'il y a intérêt à étudier l'effet pathogène des différentes souches cristallophores de *B. cereus* en tenant compte des insectes dont elles sont isolées, insectes phytophages ou insectes s'attaquant aux produits alimentaires stockés (farines, graines, cire, pollen, etc.).

Il n'était cependant pas exclu (et la preuve était déjà fournie à ce point de vue par la souche *alesti*) que certains germes puissent être pathogènes pour les insectes des deux groupes.

Si les recherches ont été surtout limitées aux trois formes de bactéries mentionnées, c'est uniquement parce qu'il s'agissait de germes connus et bien étudiés qu'on pouvait distinguer d'après leurs caractères biochimiques, suffisamment bien définis.

Il était à prévoir que d'autres souches de bactéries aérobies sporogènes et cristallophores parasites de larves de Lépidoptères seraient par la suite découvertes.

C'est ainsi que de nouvelles souches de ces bactéries ont été découvertes récemment en Allemagne Occidentale, en Europe Centrale et en U. R. S. S.

A la Conférence Internationale concernant la pathologie des insectes à Prague (1958) il a été décidé qu'un libre échange des souches bactériennes pathogènes pour les insectes devait être effectué entre divers pays afin de pouvoir confronter leur effet sur les insectes de différentes régions du monde.

C'est ainsi que le Service de Pathologie des Insectes de l'Institut Pasteur de Paris a pu entrer en possession d'un certain nombre de souches bactériennes isolées en Tchécoslovaquie, en U. R. S. S. et en Allemagne Occidentale.

Il était intéressant d'éprouver l'effet de ces diverses souches cristallophores de *B. cereus* sur divers insectes.

Il convient en effet, si fastidieux que cela paraisse au premier abord, d'enregistrer l'effet, sur les larves de Lépidoptères, de toutes les souches, quelle que soit leur origine, pour pouvoir

par la suite faire la synthèse des résultats obtenus dans diverses parties du monde avec des souches variées.

Il est indéniable que leur effet est différent selon la physiologie propre de chaque insecte, non seulement à un âge déterminé, mais aussi au cours de ses différents stades correspondant à divers états physiologiques.

Nous ne connaissons que peu de chose sur la physiologie de la plupart des insectes avec lesquels nous avons eu l'occasion de travailler, et il est impossible de considérer tous les travaux, y compris celui que nous présentons, comme définitifs.

Les résultats obtenus sont destinés à confronter l'effet pathogène de tel ou tel germe employé avec l'état physiologique de l'insecte utilisé.

Il est nécessaire en somme d'accumuler les faits concernant l'effet pathogène des bactéries sur divers insectes afin d'offrir aux chercheurs la possibilité de les interpréter d'une manière utile au fur et à mesure des progrès qui seront réalisés dans le domaine de la physiologie de tous les insectes qui sont utilisés dans les expériences.

C'est à ce titre que nos expériences sont présentées afin de pouvoir être comparées avec celles qui ont été effectuées avec d'autres germes et sur le même insecte.

Elles compléteront, nous semble-t-il, d'une manière utile, tout ce qui a été publié antérieurement quant à l'effet pathogène sur les insectes des bactéries sporogènes et cristallophores et serviront certainement à compléter les tableaux d'ensemble de l'effet de ces bactéries sur les larves de Lépidoptères, tableaux qui ont déjà été proposés par Steinhäus [8] et Heimpel et Angus [6].

Notons que, sur ce plan, l'insecte qui se prête particulièrement bien à ces expériences est le *Bombyx mori*, surtout lorsqu'il s'agit d'élevages sains qui ne comportent que des individus vigoureux.

Cet insecte constitue en effet pour toute expérimentation et toute manipulation un sujet de choix et ne saurait être comparé à aucun autre Lépidoptère quant à l'usage expérimental ; on peut en outre l'élever en très grande quantité.

En effet, s'il est possible, en s'entourant d'un certain nombre de précautions, d'avoir de bons élevages de *Pieris brassicae* (piéride du chou), d'*Ephestia kühniella* (mite des farines), de *Galleria mellonella* (fausse teigne des ruches), etc., ces insectes sont très souvent sujets aux attaques de prédateurs qui peuvent apporter une confusion dans l'interprétation des résultats qui seront obtenus au cours de leur infection *per os* par divers germes.

Nous estimons ainsi, contrairement à un certain nombre d'auteurs qui préconisent *Ephestia* comme un insecte de choix pour l'expérimentation concernant l'effet des bactéries aérobies

sporogènes du groupe *cereus*, que c'est plutôt le ver à soie qui devrait être employé dans ces expériences.

Grâce à la Direction de l'Institut Pasteur de Paris, un petit laboratoire de campagne a été installé au Luc, en Provence, afin d'effectuer des recherches sur l'action pathogène de diverses bactéries sur cet insecte.

Ces recherches ont été entreprises avec des vers sains provenant de grainages appropriés.

Il ne s'agissait pas seulement d'établir l'effet des germes à l'état de suspension dans l'eau physiologique, mais aussi l'effet des inclusions cristallines extraites de leur corps par une méthode appropriée [4].

Nous avons eu la bonne fortune de bénéficier, à ce point de vue, de l'aide de M. le Dr Fitz-James, de la Western University, à London (Ontario, Canada), qui a bien voulu faire préparer pour nous des inclusions cristallines conservées dans l'eau physiologique, préparées en 1959, et qui furent utilisées dans les expériences entreprises au printemps 1959 et au printemps 1960. Dans ce dernier cas il s'agissait d'inclusions cristallines congelées, puis décongelées avant leur utilisation.

Ces inclusions cristallines n'étaient pas entièrement débarrassées des spores, mais presque totalement débarrassées des corps bactériens.

Les bactéries utilisées furent :

1° *B. cereus* var. *dendrolimi* (= *Bacillus dendrolimus* Talalaiev) Toumanoff et Le Corroller 1959 ;

2° *B. cereus* var. *galleriae* Schwetzova (U. R. S. S.) ;

3° *B. cereus* var. *euxoae*, souche isolée par Krieg à Darmstadt en Allemagne (1).

Nous avons dû nous contenter de ces trois souches en ce qui concerne les expériences sur les inclusions cristallines.

Toutefois, quelques essais ont pu être faits avec des suspensions bactériennes âgées de ces trois variétés de *B. cereus* et aussi d'un *B. cereus* qui fut rapporté par nous à la variété *thuringiensis*, isolé de *Plodia interpunctella* par Weiser en Tchécoslovaquie, et que nous appellerons *B. cereus* var. *thuringiensis* souche Weiser.

Nous relaterons tout d'abord les expériences effectuées avec les inclusions cristallines en 1959 et 1960 pour comparer leur effet avec celui des suspensions bactériennes provenant généralement de cultures âgées de 6 à 10 jours.

(1) Souche dont la description détaillée sera présentée dans un travail ultérieur, et qui fut mentionnée antérieurement [15].

A. — EXPÉRIENCES AVEC LES INCLUSIONS CRISTALLINES.

Nous avons évalué tout d'abord le nombre de cristaux par millimètre cube dans les suspensions que nous avons reçues du D^r Fitz-James et nous les avons ensuite diluées de façon à humecter les feuilles de mûrier avec des doses toujours égales, mais à diverses concentrations.

Bien que cette manière de procéder soit peut-être approximative, nous avons constaté qu'elle est valable puisque les résultats

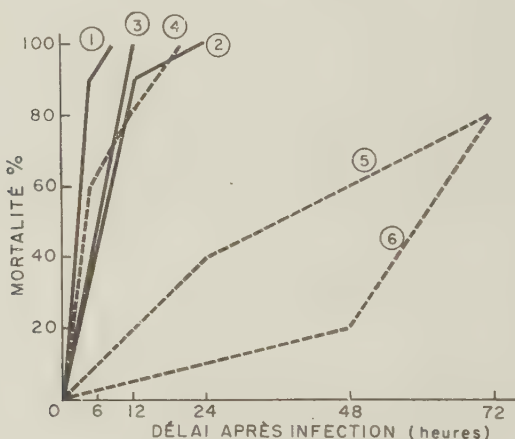


FIG. 1. — Mortalité provoquée par les inclusions cristallines à diverses concentrations (Exp. 1959). 1, *B. cereus galleriae* : 1 000 gouttes au litre. 2, *B. cereus euzoae* : 500 gouttes au litre. 3, *B. cereus dendrolimi* : 2 500 gouttes au litre. 4, *B. cereus galleriae* : 500 gouttes au litre. 5, *B. cereus euzoae* : 200 gouttes au litre. 6, *B. cereus dendrolimi* : 1 000 gouttes au litre. La suspension mère a été ramenée uniformément à 150 000 cristaux au millimètre cube. Chaque ver a reçu 1 cm³ de dilution.

obtenus avec des concentrations croissantes ont montré un accroissement très net de la mortalité enregistrée au cours de nos expériences.

Nous avons utilisé toujours le même nombre de feuilles de mûrier humectées dans la suspension d'inclusions cristallines et nous nous sommes assurés également que ces feuilles étaient entièrement consommées par les vers en expérience avant que leur soit fourni un autre repas composé de feuilles non traitées.

Disons tout de suite que les essais effectués en 1959 ne nous permirent pas de faire des comparaisons très exactes des résultats

obtenus. Nous pouvons néanmoins conclure de ces essais entrepris avec des inclusions cristallines d'origine récente et exposés dans

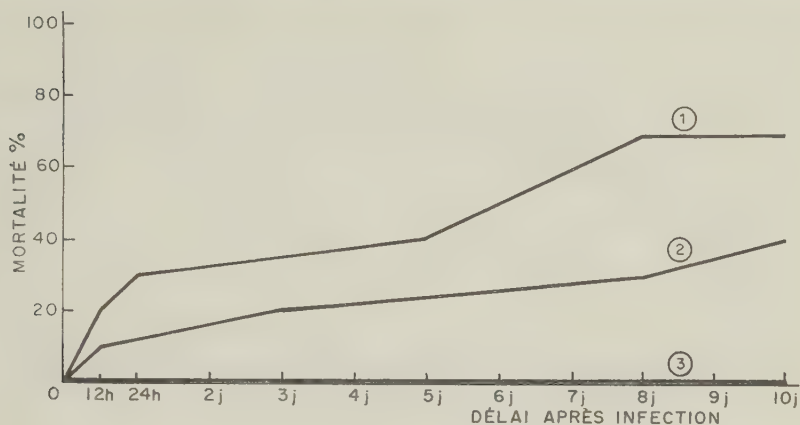


FIG. 2. — Mortalité provoquée par les inclusions cristallines à la concentration de 50 gouttes au litre. 1, *B. cereus euxoae*. 2, *B. cereus galleriae* U. R. S. S. 3, *B. cereus dendrolimi*. La suspension mère contenait environ 150 000 cristaux au millimètre cube. Chaque ver a reçu 1 cm³ de la dilution.

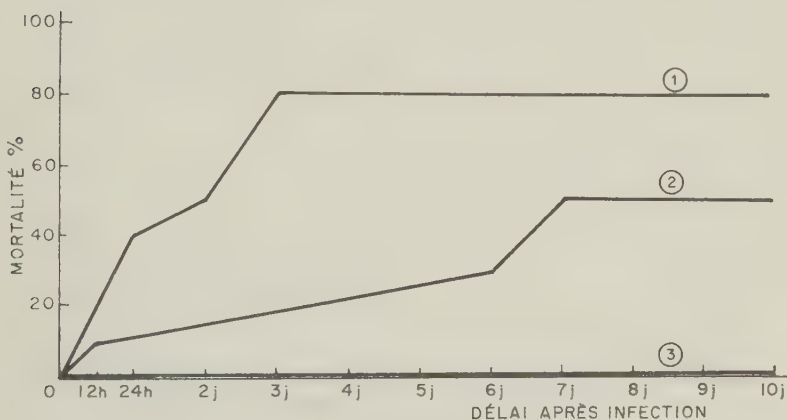


FIG. 3. — Mortalité provoquée par les inclusions cristallines à la concentration de 200 gouttes au litre. 1, *B. cereus euxoae*. 2, *B. cereus galleriae* U. R. S. S. 3, *B. cereus dendrolimi*. La suspension mère contenait environ 150 000 cristaux au millimètre cube. Chaque ver a reçu 1 cm³ de la dilution.

la figure 1 que c'est *B. cereus* var. *galleriae* qui s'est avéré le plus virulent, que *B. cereus* var. *euxoae* est un peu moins virulent, et qu'enfin *B. cereus* var. *dendrolimi* est le moins virulent des trois.

Une gamme de dilutions plus étendue a été utilisée en 1960, ce qui rend plus précise l'interprétation des résultats. Les expé-

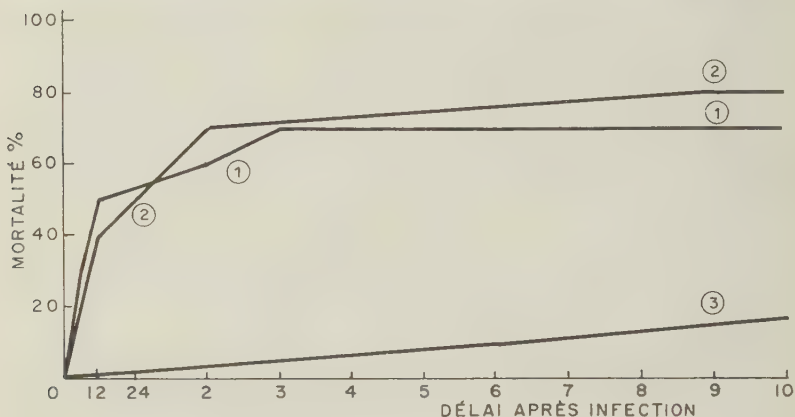


FIG. 4. — Mortalité provoquée par les inclusions cristallines à la concentration de 400 gouttes au litre. 1, *B. cereus euxoae*. 2, *B. cereus galleriae* U. R. S. S. 3, *B. cereus dendrolimi*. La suspension mère contenait environ 150 000 cristaux au millimètre cube. Chaque ver a reçu 1 cm³ de la dilution.

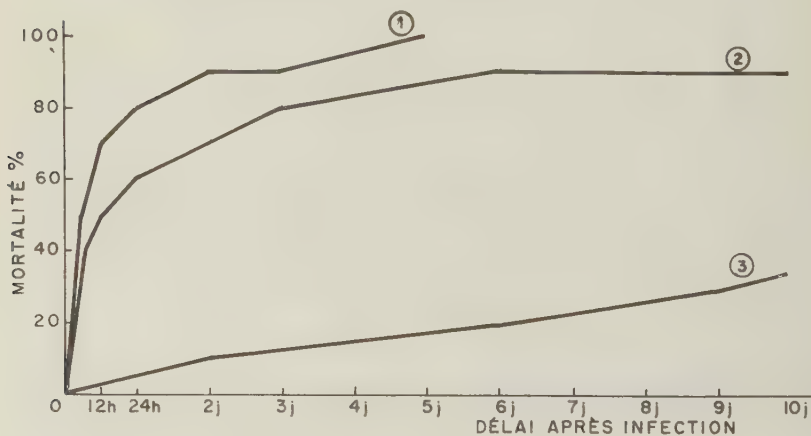


FIG. 5. — Mortalité provoquée par les inclusions cristallines à la concentration de 800 gouttes au litre. 1, *B. cereus euxoae*. 2, *B. cereus galleriae* U. R. S. S. 3, *B. cereus dendrolimi*. La suspension mère contenait environ 150 000 cristaux au millimètre cube. Chaque ver a reçu 1 cm³ de la dilution.

riences ont été rendues comparables en diluant les suspensions d'origine afin d'obtenir pour chaque souche une suspension mère contenant uniformément 150 000 cristaux au millimètre cube.

Cette série d'expériences, portant sur des inclusions cristallines datant de plus d'un an, nous a permis de nous rendre

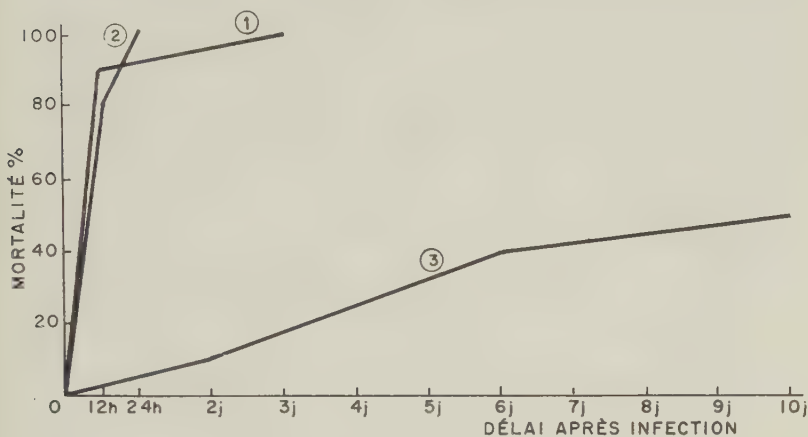


FIG. 6. — Mortalité provoquée par les inclusions cristallines à la concentration de 1 600 gouttes au litre. 1, *B. cereus euxoae*. 2, *B. cereus galleriae* U. R. S. S. 3, *B. cereus dendrolimi*. La suspension mère contenait environ 150 000 cristaux au millimètre cube. Chaque ver a reçu 1 cm³ de la dilution.

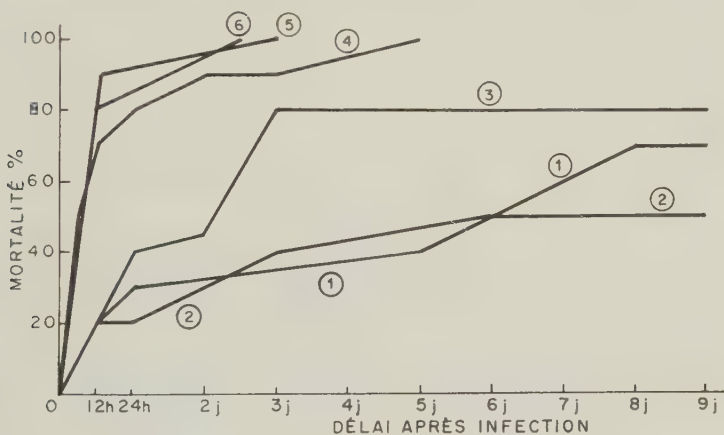


FIG. 7. — Mortalité provoquée par les inclusions cristallines de *B. cereus* var. *euxoae* à diverses concentrations. 1, 25 gouttes au litre. 2, 50 gouttes au litre. 3, 100 gouttes au litre. 4, 400 gouttes au litre. 5, 800 gouttes au litre. 6, 1 600 gouttes au litre.

compte (fig. 2, 3, 4, 5, 6) qu'à doses égales c'est *B. cereus euxoae* qui est le plus virulent, suivi de près par *B. cereus galleriae*. *B. cereus dendrolimi* s'est montré nettement moins efficace.

C'est ainsi que la mortalité de 50 p. 100 est atteinte ou dépassée pour les deux premières souches avec des doses corres-

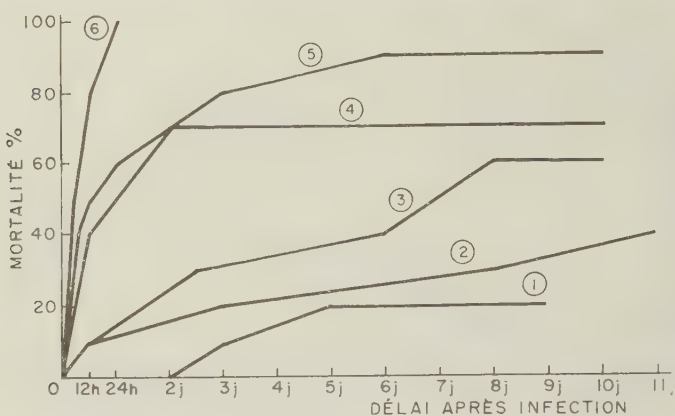


FIG. 8. — Mortalité provoquée par les inclusions cristallines de *B. cereus* var. *galleriae* U. R. S. S. à diverses concentrations. 1, 25 gouttes au litre. 2, 50 gouttes au litre. 3, 100 gouttes au litre. 4, 400 gouttes au litre. 5, 800 gouttes au litre. 6, 1 600 gouttes au litre.

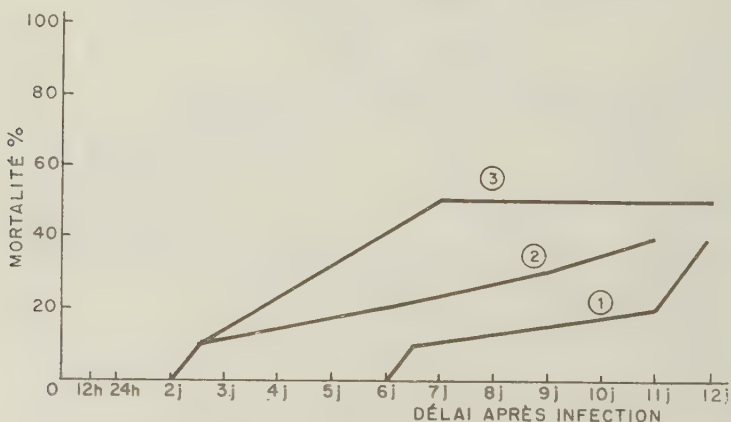


FIG. 9. — Mortalité provoquée par les inclusions cristallines de *B. cereus* var. *dendrolimi*, à diverses concentrations. 1, 800 gouttes au litre. 2, 1 600 gouttes au litre. 3, 3 200 gouttes au litre.

pondant à C gouttes au litre d'une suspension contenant 150 000 cristaux au millimètre cube. Pour arriver à 100 p. 100 de mortalité il faut DCCC gouttes pour *B. cereus euxoae* et MDC gouttes pour *B. cereus galleriae*.

Avec *B. cereus* var. *dendrolimi* la mortalité reste nulle avec des doses provoquant 50 à 80 p. 100 de mortalité chez les deux autres. Aux plus fortes doses utilisées, la mortalité provoquée par les cristaux de *B. cereus* var. *dendrolimi* ne dépasse jamais 50 p. 100, alors qu'elle est de 100 p. 100 chez les deux autres.

Les figures 7, 8 et 9 représentent la progression de la mortalité provoquée chez les vers par chacune de ces trois variétés de *B. cereus* à diverses dilutions de la suspension.

B. — EXPÉRIENCES AVEC LES SUSPENSIONS BACTÉRIENNES.

De même que pour les expériences relatives aux cristaux, ces essais ont porté sur deux années consécutives.



FIG. 10. — Virulence comparée de trois souches de *B. cereus*, à la dose de une anse pour 1 cm³ (Exp. 1959). 1. *B. cereus dendrolimi*. 2. *B. cereus euxoae*, 3. *B. cereus thuringiensis*.

En 1959, quelques expériences seulement ont été effectuées avec des souches de :

- 1° *Bacillus cereus* var. *euxoae* Toumanoff et Le Corroller ;
- 2° *Bacillus cereus* var. *dendrolimi* (Talalaiev) Toumanoff et Le Corroller ;
- 3° *Bacillus cereus* var. *thuringiensis* (Tchécoslovaquie, Weiser).

De ces trois souches, *B. cereus euxoae* s'est montrée nettement la plus virulente, comme on peut le constater sur la figure 10, la mortalité qu'elle provoque atteignant 100 p. 100 en six heures avec

la dilution 1 anse de platine/1 cm³, pour tomber à 10 p. 100 à la dilution de 1 anse/1 000 cm³ (fig. 11).

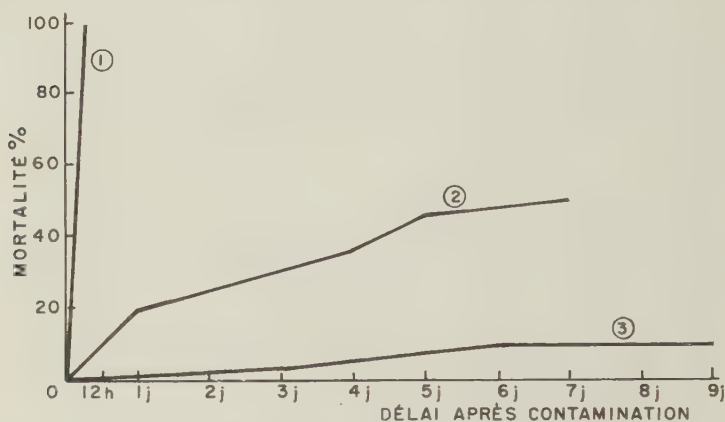


FIG. 11. — Mortalité provoquée par *B. cereus euxoae* (Exp. 1959). 1, une anse pour 1 cm³. 2, une anse pour 500 cm³. 3, une anse pour 1 000 cm³.

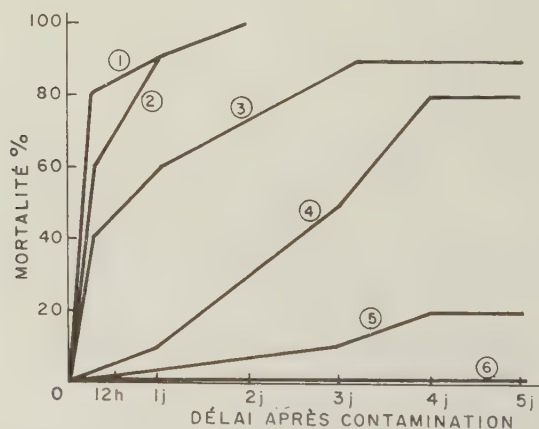


FIG. 12. — Mortalité provoquée par *B. cereus euxoae* à des doses variées. 1, une anse pour 1 cm³. 2, une anse pour 10 cm³. 3, une anse pour 50 cm³. 4, une anse pour 100 cm³. 5, une anse pour 250 cm³. 6, une anse pour 500 cm³.

Au cours des expériences de 1960, des dilutions plus variées, allant de 1 anse/1 cm³ à 1 anse/1 000 cm³, ont été essayées sur cinq variétés de *B. cereus*. Aux trois souches déjà utilisées l'année

précédente ont été ajoutées deux souches de *B. cereus* provenant de *galleria* :

B. cereus var. *thuringiensis* (isolé de *Galleria*) en Allemagne ;

B. cereus var. *galleriae* de l'U. R. S. S. (Schwetzova).

Deux de ces cinq souches ont montré une forte virulence : *B. cereus euxoae* et *B. cereus galleriae* de l'U. R. S. S.

Comme on peut le constater sur les figures 12 (var. *euxoae*) et 13 (var. *galleriae* de l'U. R. S. S.), ces deux variétés ont donné des résultats très voisins : mortalité de 100 p. 100 avec les concentrations de 1 anse/1 cm³ et 1 anse/10 cm³ ; de 80 p. 100 avec

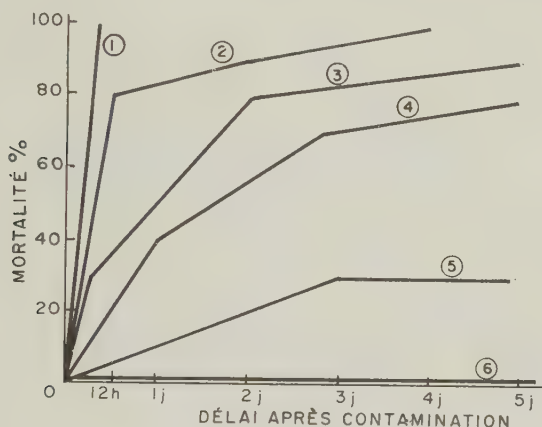


FIG. 13. — *B. cereus galleriae* U. R. S. S. Même légende que fig. 12.

1 anse/100 cm³ ; mortalité nulle avec 1 anse/500 cm³ et les concentrations plus faibles.

B. cereus var. *thuringiensis* isolé de *Galleria* [Allemagne] (fig. 14) s'est révélé beaucoup moins efficace. Avec cette souche la mortalité de 100 p. 100 n'a jamais été obtenue, même avec la concentration la plus forte, et elle devient nulle à partir de 1 anse/50 cm³.

Le *B. cereus thuringiensis* (2) a montré un comportement assez particulier : alors qu'aucune mortalité n'avait été observée chez les vers avec des concentrations allant de 1 anse/10 cm³ à 1 anse/1 000 cm³, cette mortalité a atteint 100 p. 100 en vingt-quatre heures avec la dilution 1 anse/1 cm³.

B. cereus dendrolimi s'est révélé presque inoffensif. Avec cette souche, la dose la plus forte (1 anse/1 cm³) n'a provoqué qu'une

(2) De Weiser isolé de *Plodia interpunctella*.

mortalité faible et lente : 20 p. 100 en cinq jours. Les vers morts ne présentaient d'ailleurs pas les symptômes caractéristiques de la flacherie.

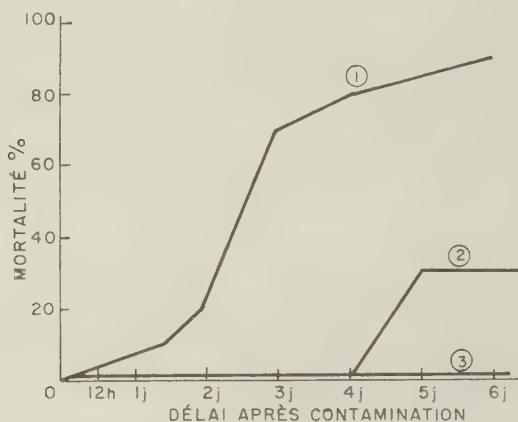


FIG. 14. — *B. cereus galleriae* Allemagne. Même légende que fig. 12.



FIG. 15. — Comparaison de la mortalité provoquée par diverses souches de *B. cereus* à la dose de 1 anse pour 1 cm³. 1, *B. cereus dendrolimi*. 2, *B. cereus euzoae*. 3, *B. cereus galleriae* (Allemagne). 4, *B. cereus galleriae* U. R. S. S.

La figure 15 indique la progression de la mortalité pour les diverses souches étudiées, à la dose de 1 anse/1 cm³. Toutefois nous n'y avons pas fait figurer *B. cereus* var. *thuringiensis*, dont le comportement nous a semblé anormal.

La comparaison des résultats 1959 et 1960 fait apparaître une

sensible atténuation de la virulence, la mortalité en 1960 s'étant constamment montrée plus faible, aussi bien avec les cristaux qu'avec les suspensions bactériennes. Il est possible que ce fait provienne du vieillissement des souches et des cristaux. Peut-être aussi doit-on l'attribuer à une plus grande résistance des vers utilisés en 1960, soit qu'ils proviennent d'un élevage plus robuste, soit que les agents extérieurs, et en particulier la température, leur aient été plus favorables.

Toutes les expériences d'une même année ayant été menées dans des conditions identiques, simultanément et avec des vers de même provenance et de même âge, les résultats restent comparables : qu'il s'agisse des expériences menées avec les suspensions bactériennes ou des essais avec les inclusions cristallines, les deux variétés *euxoae* et *galleriae* U. R. S. S. se sont montrées constamment plus virulentes que les autres, tandis que la variété *dendrolimi* est beaucoup moins efficace aux fortes doses et devient à peu près inoffensive à faible concentration.

Bien qu'il ait été signalé que diverses souches de *cereus* cristallophores entomophages manifestent une spécificité très nette, notre travail révèle que certaines souches, notamment la souche *galleriae* d'U. R. S. S., présentent à ce point de vue un comportement remarquable qui cadre difficilement avec les faits connus.

Ceci montre qu'on ne doit pas faire une règle générale de l'effet des diverses souches de *cereus* entomophytes sur des insectes différents ayant un régime alimentaire varié.

Un fait ressort d'une manière très nette de nos essais, c'est que *B. cereus* var. *dendrolimi* isolé en Sibérie de *Dendrolimus sibiricus* (« ver à soie sauvage », parasite des conifères) et qui a été reconnu très voisin de l'agent pathogène de la flacherie des vers à soie domestiques au Japon, *B. cereus* var. *sotto*, n'est qu'à peine ou pas du tout pathogène pour les vers à soie élevés au Luc, en Provence (3).

On ne saurait ainsi assimiler la souche de *cereus dendrolimi*, qui fut isolée par Talalaïev et décrite sommairement sous le nom de *B. dendrolimus*, à *B. cereus* var. *sotto*, du Japon, malgré leur ressemblance apparente qui fut notée antérieurement [14].

(3) Dans un récent travail que nous avons reçu après la rédaction de cette note, Schwetzova [7] a noté que *B. cereus* var. *dendrolimi* (*B. dendrolimus*, reçu de Talalaïev) se montrait expérimentalement très pathogène pour les chenilles parasitant les vergers, les jardins potagers et les forêts, mais était pratiquement inoffensif pour les chenilles de la fausse teigne des ruches. Elle a remarqué également que la souche tchèque de *B. thuringiensis* (certainement celle de Weiser) était assez fortement pathogène pour les chenilles de la mite de la farine, mais tout à fait inefficace à l'égard de nombreuses autres larves de Lépidoptères.

Par son effet pathogène très manifeste sur les vers à soie, *B. cereus* var. *euxoae*, d'*Euxoa segetum* (souche du Dr Krieg), s'avère très proche de *B. cereus* var. *alesti* à laquelle il ressemble par la formation de pigment rouge sur le jaune d'œuf coagulé.

Il a été remarqué que *B. thuringiensis* de Tchécoslovaquie, isolé de *Plodia interpunctella*, s'avère extrêmement pathogène pour les vers, à l'état de suspensions, à une dose très élevée (1 anse de culture pour 1 cm³ d'eau physiologique) et absolument inoffensif à une dose dix fois moindre.

On doit tenir compte du fait que parfois une dilution très faible d'une culture bactérienne peut entraver ou suspendre son action pathogène.

Cette nouvelle contribution à l'effet de quelques *cereus* cristallophores récemment décrits peut s'inscrire utilement dans le cadre de nos connaissances générales sur les bactéries aérobies parasites d'insectes et servir à l'établissement d'un tableau d'ensemble se rapportant à leurs propriétés pathogènes, tant sur le plan théorique que pratique.

RÉSUMÉ.

L'étude comparée de la virulence pour les vers à soie de quelques variétés récemment décrites de *Bacillus cereus* Frank. et Frank., entomophages et cristallophores, et de leurs inclusions cristallines a mis en évidence des différences notables dans l'action de ces divers germes.

C'est ainsi qu'une souche isolée de *Dendrolimus sibiricus*, en Sibérie Orientale par Talalaïev, s'est montrée faiblement pathogène pour les vers à l'état de suspensions bactériennes ou d'inclusions cristallines. Il s'agit cependant du point de vue biochimique d'une souche très proche de *B. cereus* var. *sotto* du Japon [14] et dont l'utilisation contre les chenilles de *Dendrolimus* dans la nature (en Sibérie) a donné des résultats remarquables [8].

Parmi d'autres souches récemment décrites, *B. cereus* var. *euxoae* Toumanoff et Le Corroller et *B. cereus* var. *galleriae* d'U. R. S. S. (Schwetzova) sont les plus pathogènes pour les vers, aussi bien à l'état d'inclusions cristallines qu'en suspensions bactériennes.

La forme de *cereus* isolée en Tchécoslovaquie, qui peut être considérée comme *B. cereus* var. *thuringiensis*, est très pathogène, mais à dose très forte seulement (1 anse/1 cm³ d'eau physiologique) [les expériences avec cette forme n'ont été effectuées qu'avec des suspensions bactériennes]; une dilution plus forte (1 anse/10 cm³) suspend entièrement son effet pathogène.

Il ressort de ces expériences qu'un germe (*cereus* var. *galleriae*

d'U. R. S. S.) isolé d'insecte non phytophage (4) est tout particulièrement pathogène pour les vers à soie, comme du reste pour de nombreux autres insectes.

Enfin un germe que nous avons assimilé à *B. thuringiensis* [14] et qui fut isolé et reconnu virulent pour les chenilles de *Galleria mellonella* par Krieg et Frantz en Allemagne s'est révélé très peu pathogène pour les vers à soie.

SUMMARY

COMPARATIVE VIRULENCE FOR SILK-WORMS (*Bombyx mori* L.) OF CERTAIN ENTOMOPHAGOUS AND CRISTALLOPHOROUS VARIETIES OF *B. cereus* AND THEIR CRYSTALLINE INCLUSION BODIES.

The study demonstrates marked differences in the virulence of these different varieties.

Bacterial suspensions or crystalline inclusion bodies of a strain isolated from *Dendrolimus sibiricus* by Talalaiev in Eastern Siberia proved weakly pathogenic for silk-worms, despite the fact that this strain yielded excellent results in the control of *Dendrolimus* caterpillars in the field (coniferous forests in Siberia) [9].

However this strain is biochemically closely related to *B. cereus* var. *sotto* (Japan) [15] which is extremely pathogenic for silk-worms.

Among other recently mentioned or described strains [15] *B. cereus* var. *euxoæ* (isolated by Krieg in West Germany from *Euxoa* sp.) and *B. cereus* var. *galleriæ* from U.R.S.S. (Schwetzova) are the most pathogenic for silk-worms, in the state of crystalline inclusion bodies as well as under the form of bacterial suspensions.

The *B. cereus* strain isolated from *Plodia interpunctella* Czechoslovakia (Weiser) (which may be considered as *B. cereus* var. *thuringiensis*) [15] is very pathogenic for silk-worms, but at high doses only [1 loop/1 cm³ saline] (the experiments with this strain were carried out only with bacterial suspensions); at higher dilutions (1 loop/10 cm³) the pathogenicity completely disappears.

The experiments demonstrate that a germ (*B. cereus* var. *galleriæ* from U.R.S.S.) isolated from *Galleria mellonella* by Schwetzova is highly pathogenic for silk-worms and for many other insects (Schwetzova 1959) [7] and that the *cereus* strain isolated by Krieg

(4) Notons toutefois que les chenilles de *Galleria mellonella*, sans être phytophages, ingèrent avec la cire les grains de pollen qui peuvent s'y trouver, parfois en grand nombre.

in Germany from *Galleria mellonella* formerly identified as *B. thuringiensis* [15], which proved virulent for caterpillars of same insect in Krieg and Frantz experiments, had a very low pathogenicity for silk-worms.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANGUS (T. A.). *Nature*, 1954, **173**, 545.
 - [2] ANGUS (T. A.). *Canad. J. Microbiol.*, 1956, **2**, 122.
 - [3] ANGUS (T. A.). *Canad. J. Microbiol.*, 1956, **2**, 122.
 - [4] FITZ-JAMES (P. C.), TOUMANOFF (C.) et YOUNG (E. I.). *Canad. J. Microbiol.*, 1958, **4**, 385.
 - [5] FITZ-JAMES (P. C.) et YOUNG (E. I.). *J. Bact.*, 1959, **78**, 743.
 - [6] HEIMPEL (A. M.) et ANGUS (T. A.). *Proceedings Tenth International Congress of Entomology*, 1956, vol. **4**, (1958).
 - [7] SCHWETZOVA (O.). in *Methode biologique de la lutte contre les insectes nuisibles pour les plantes*. pp. 192-201, Edit. Acad. Sc. Agric. Ukraine, Kiev, 1959.
 - [8] STEINHAUS (E. A.). Laboratory of Insect pathology, Department of Biological control, University of California, Berkeley, n° 4, 1957, Mimeographed series.
 - [9] TALALAIEV (E. A.). *Microbiologia*, 1952, **25**, 99 (en russe).
 - [10] TOUMANOFF (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 570.
 - [11] TOUMANOFF (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 486.
 - [12] TOUMANOFF (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 660.
 - [13] TOUMANOFF (C.). *Int. Conference Insect Pathol. and Biol. Control*, 1958.
 - [14] TOUMANOFF (C.) et VAGO (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 338.
 - [15] TOUMANOFF (C.) et LE CORROLLER (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 680.
 - [16] VANKOVA (J.). *Folia Biologica*, 1957, **3**, 175.
-

CYCLE VITAL DE BACTÉRIES PHYTOPATHOGÈNES ADAPTÉES AU MILIEU MARIN

par Jean BRISOU et Huguette VARGUES (*)
(avec la collaboration technique de M. MOULIN)

(Ecole de Médecine de Poitiers et Collège Scientifique de Tours)

On admet, notamment depuis les travaux d'Hauduroy (1924) [1], l'existence de formes filtrables de bactéries dans le milieu extérieur, et particulièrement dans les eaux de mer puisées à proximité des rivages. L'un de nous [2] a récemment obtenu la réversion de ces états filtrables en formes normales. Les conclusions que portait à formuler l'expérimentation ont reçu l'approbation d'Hauduroy [3].

Depuis, nous avons encore obtenu de nouvelles réversions en partant de filtrats de coquillages. Une *Erwinia salicis* a retenu notre attention en raison de son pouvoir pathogène pour *Microtus orcadensis* et de son agglutinabilité par un sérum expérimental anti-*Erwinia betivora*.

Il est donc expérimentalement démontré que le milieu marin contient des bactéries filtrables, que des germes peuvent donner des cultures normales si des conditions favorables leur sont offertes. De nos expériences, nous avons formellement exclu toute adjonction de liquide biologique (sérum, ascite ou autre). En nous inspirant des travaux de Mandel et de ses collaborateurs, des recherches de Salton, de Kefneth Mac Quillen [4, 5, 6, 7], nous nous sommes arrêtés à un milieu simple dont voici la composition :

Hydrolysat de caséine : 1 p. 100 ; Saccharose : 10 p. 100 ; SO_4Mg , 7 H_2O : 1 p. 100. Ajustage à pH 7,2. Stérilisation à 100° pendant vingt minutes. Nous avons préparé ce milieu que nous appelons par convention milieu MS (Magnésium-Saccharose) avec de l'eau douce et avec de l'eau de mer.

Jusqu'ici, nous avons donc recherché l'obtention de formes bactériennes normales en partant de filtrats de coquillages [2]

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 novembre 1960.

obtenus avec des filtres Iena G5. Nous avons poursuivi l'expérimentation en suivant la voie inverse, et cela dans les conditions d'adaptabilité les plus difficiles.

Deux bactéries phytopathogènes authentiques (1) *Erwinia phytophthora* et *Xanthomonas tardicrescens* respectivement isolées d'une maladie du poivrier au Mexique et d'une affection végétale au Japon ont été l'objet de l'expérimentation actuelle. Rien ne pouvait être aussi éloigné de la microbiologie marine que ces deux bactéries adaptées à des plantes terrestres. L'un de nous a déjà montré que de tels germes peuvent être virulents pour des animaux à sang chaud, notamment *Microtus orcadensis* [8]; nous les avons adaptés au milieu marin en les cultivant dans une eau de mer peptonée à 1 p. 100 et bien entendu stérilisée à 110°.

Les cultures étaient effectuées à l'obscurité et à la température du laboratoire. Elles ont été d'emblée tentées à la concentration saline de l'eau de mer et non par passages successifs sur des eaux de salinité croissante.

Les premières cultures furent très lentes. Le temps de latence atteignait facilement quatre à cinq jours avant qu'une densité optique puisse être mesurable.

Au sixième passage, à raison d'un repiquage tous les dix jours, nous avons obtenu des croissances rapides tout à fait comparables aux cultures témoins que nous observions en milieu normal à l'eau douce.

Une fois bien adaptés à la salinité marine, les germes furent transplantés avec plein succès sur des géloses à l'eau de mer et conservés sur ce milieu. Les souches nouvelles ainsi obtenues ont reçu par convention les numéros *bis*.

Ainsi la souche *Xanthomonas tardicrescens* 143 de notre collection devint 143 *bis*, l'*Erwinia phytophthora* 145 de notre souche est devenue 145 *bis*.

Le premier de ces microbes fut conservé pendant un mois dans l'eau de mer peptonée et à l'obscurité. Au bout de ce temps, la culture se présentait sous l'aspect d'un liquide parfaitement limpide, surmontant un abondant dépôt visqueux. Examiné au microscope à contraste de phase, ce dépôt était constitué d'un riche agglomérat de formes sphériques extrêmement fines, de sphéropastes et de quelques images filamenteuses très longues et souvent enchevêtrées.

Cette culture 143 *bis* fut alors soumise à la filtration sur filtre Iena G5. Le filtrat aussitôt ensemencé sur le milieu MS à l'eau de mer et MS à l'eau douce donna, en quarante-huit heures, naissance à des cultures abondantes, riches en sphéropastes, en filaments et en formes normales très mobiles. Le repiquage sur

(1) Collection P. J. Starr, Université de Californie, Davis, U. S. A.

gélose à l'eau de mer nous donnait une nouvelle souche 143 *ter*. Toutes les souches, 143 originelle, 143 *bis* et 143 *ter*, 145 originelle et 145 *bis* ont été comparées sur le plan biochimique et antigénique (tableau I).

CARACTÈRES ANTIGÉNIQUES DES SOUCHES.

Nous possédons à l'heure actuelle 33 sérums agglutinant les germes du groupe *Achromobacter-Erwinia*.

Par convention, ces sérums sont cotés de 1 à 33.

Les agglutinations positives ont été obtenues par la technique des agglutinations en tubes et centrifugation avec les fréquences suivantes :

SOUCHES	SÉRUMS AGGLUTINANTS
145	14, 15, 16, 28, 29 et 30.
145 <i>bis</i>	5, 6, 10, 13, 25 et 29.
143	6, 8, 14, 15, 16, 21, 25 et 33.
143 <i>bis</i>	21, 29 et 33.
143 <i>ter</i>	5, 6, 13, 29 et 33.

Pour les deux souches 145, nous retrouvions une communauté antigénique correspondant au sérum 29 (*Achr. pikowsky*).

Les trois souches 143 possédaient un antigène commun correspondant au sérum 33 (*Achr. venenosum*) et des communautés entre 143 et 143 *bis* 21 (*Erw. carotovora*).

L'un de nous a déjà souligné et montré dans un autre travail la fréquence des agglutinations croisées entre *Erwinia* et *Achromobacter*. On confirme encore ici cette notion, du plus grand intérêt taxinomique.

DISCUSSION.

Cet ensemble expérimental joint au précédent [2] confirme l'existence du cycle que peuvent emprunter les bactéries soumises à des changements de vie ou à des agressions. Nous montrons en particulier que les antibiotiques et les agents lytiques ne sont pas nécessaires à l'apparition des formes L, sphéroplastes ou formes filtrables. Billy [10] a récemment décrit les modifications morphologiques que subissent des germes anaérobies telluriques en présence de l'eau de mer. Ici nous avons retrouvé les images décrites par les auteurs qui ont suivi les cycles microbiens, mais nous montrons que ces formes sont viables, tout au moins dans certains cas. Il suffit de faire appel, lors des repiquages, à des milieux favorisant la multiplication des protoplastes, D'autres recherches actuellement en cours,

TABLEAU I.

	<i>Xanthomonas tardicrescens</i>			<i>Erwinia phytophthora</i>	
	143	143 bis	143 ter	145	145 bis
Morphologie	Bacille	Polymorphe		Bacille	Polymorphe
Mobilité	+	+	+	+	+
GRAM	—	—	—	—	—
Gélatine	—	—	—	×	—
Nitrites	+	+	+	+	+
Lactose	—	—	—	+	+
Glucose	+	—	—	—	+
Arabinose	—	—	—	—	—
Xylose	+	+	—	+	+
Rhamnose	+	—	—	+	+
Galactose	+	—	—	+	—
Lévilose	+	—	—	++	+
Mannite	+	+	—	++	+
Dulcite	—	—	—	—	—
Adonite	—	—	—	—	—
Inositol	—	—	—	—	—
Maltose	—	—	—	—	—
Saccharose	+	—	—	+	+
Esculine	+	—	—	+	+
Amidon	—	—	—	—	—
Arginine	—	—	—	—	—
Urée	—	—	—	—	—
Indole	—	—	—	—	—
H ₂ S	+	—	—	+	—
Citrate	+	—	—	+	—
APP et TDAM	—	—	—	—	—
VF	—	—	—	+	+
RM	+	—	—	—	+
Pectine	+	+	+	+	+
Virulence pour la souris	—	—	++	++	++

Arginine : arginine désamidase (test Manchester). — Urée : sur milieu de Fergusson. — H₂S : papier au sous-acétate de Pb surmontant la culture en eau peptonée. — Gélatine : test de Kohn. — Citrate : citrate de Na en milieu de Koser. — APP : test de l'acide phénylpyruvique formé à partir de la L-phénylalanine. — TDAM : tryptophane désaminase. — VP : test de Voges-Proskauer. — RM : rouge de méthyle (milieu au fumarate). — Pectine : pectine méthyle estérase (solution de pectine à 2 p. 100).

Les souches 143 et 145 ont été étudiées en eau douce ; les autres dans les conditions de salinité de l'eau de mer.

montrent, en effet, que les cultures en eau de mer ne sont pas toujours repiquables sur les milieux solides, tandis que le milieu MS donne de belles cultures. Il importe de tenir compte de ces observations expérimentales lorsqu'on étudie la survie des bactéries terrestres en milieu marin. Bien des résultats qui ont jusqu'ici été considérés comme négatifs paraissent entachés d'erreurs faute d'avoir tenu compte des faits que nous venons de souligner.

Des observations identiques ont été faites à propos des hémocultures apparemment stériles (Carrère et Roux, Nativelle et Deparis). Nous en avons également observé d'assez nombreux exemples non publiés. Les bactéries jetées brusquement dans un nouveau biotope ne meurent pas nécessairement. Bon nombre d'entre elles subissent des transformations que l'on peut suivre, passent à des phases de résistance, au stade L, à l'état de protoplastes et de sphéropastes dont on peut dans certains cas, mais non toujours, obtenir la réversion en formes normales.

La survie, ou même la vie avec croissance active, est possible ; elle est fonction, comme nous le montrerons dans un prochain travail, des facteurs de croissance mis à la disposition des germes. Au cours de ces cycles vitaux, les microbes dissociés peuvent se reconstruire conformément aux vues exprimées en France par Tulasne et ses collaborateurs. Si certains caractères sont doués d'une certaine pérennité, comme l'attaque des nitrates et transformation en nitrites, la mobilité, parfois la protéolyse, d'autres semblent plus fragiles. Ce serait le cas en particulier des caractères glucidolytiques. Le fait est particulièrement net si l'on considère la souche 143.

Notons à propos de cette souche que sa chromogénèse, production d'un pigment caroténoïde jaune clair, n'a pas varié.

La bactérie ne change donc pas de genre, tout au moins dans les limites de notre expérience, mais d'espèce et de sérotype.

Ces notions ont déjà été exprimées par plusieurs auteurs qui ont suivi les modifications biochimiques et sérologiques des formes L (citons entre autres : Dienes, M^{me} Klieneberger-Nobel, Tulasne, Minck), ou leur pouvoir pathogène (Carrère et Roux, Lavillaureix).

Dans l'expérimentation rapportée ici, le pouvoir pathogène des germes s'est nettement modifié. Au départ ils n'étaient pathogènes que pour *Microtus orcadensis*, or, ils sont devenus très virulents pour la souris blanche, à l'exception de la souche 143 bis. Tous les faits que nous venons de rapporter renforcent l'idée que l'un de nous a déjà exprimée à différentes reprises [9] : tout ce que l'on décrit sous les termes variés de formes L, protoplastes, formes G ou M, formes monstrueuses, etc. ne sont que des *instantanés* de la vie microbienne. Les germes que nous

isolons, correspondent à un moment des cycles vitaux à l'instant précis où nous réussissons cet isolement. Si le milieu de culture offert au microbe est favorable, nous assistons à une croissance rapide d'états que nous avons pris l'habitude de considérer comme « normaux » et caractéristiques de l'espèce, du genre ou de la famille. Il est bien certain cependant que d'autres aspects existent et nous échappent souvent faute de moyens d'étude pour les mettre en évidence.

L'intérêt de notre expérimentation est de montrer que de bactéries authentiquement phytopathogènes, on peut faire des bactéries marines, halophiles, pathogènes pour la souris blanche.

Nous poursuivons des recherches similaires avec plusieurs Entérobactéries pathogènes que nous avons habituées à l'eau de mer. Les observations recueillies jusqu'ici se superposent à celles que nous venons de rapporter.

Ces expériences vont servir de point de départ à de plus vastes enquêtes sur le comportement et les conditions de vie des bactéries terrestres soumises aux conditions imposées par le milieu marin. Inversement, d'autres expériences étudient, elles aussi, l'adaptation des bactéries halophiles strictes à la vie dulçaquicole.

L'un de nous a déjà insisté sur l'ubiquité de certains microbes rencontrés aussi bien en eau de mer que dans les eaux de rivière. D'intéressants bilans de microflore ont été réalisés sur la boue des estuaires, les poissons d'eau douce, les poissons d'eau de mer, les coquillages et crustacés en collaboration avec Ménantaud, Tysset, Peloux, Vacher, Jacob, B. Brisou. Les bactéries marines ont leurs correspondants sur terre et inversement, à quelques caractères secondaires près. La microbiologie comparée de ces espèces et des différents milieux, l'étude des mutations et transformations passagères ou permanentes des microbes soumis aux modifications de milieux permettent de mieux comprendre et surtout de simplifier considérablement la taxinomie de certaines tribus et familles.

CONCLUSION.

Nous avons montré la transformation relativement rapide de deux bactéries phytopathogènes en bactéries marines, le passage de l'une d'elles par le stade filtrable et son retour à la normale. Au cours des cycles suivis par les germes, nous avons suivi les modifications morphologiques, biochimiques et antigéniques des bactéries en expérience. Certains aspects observés rappellent de très près ce que l'on décrit dans les ouvrages et les publications sous les noms de formes L, sphéropastes, protoplastes.

Ces aspects sont viables et peuvent faire retour à l'état normal ; les bactéries adaptées au nouveau milieu ont perdu certains caractères et en ont acquis de nouveaux.

RÉSUMÉ.

Les auteurs rappellent une expérience antérieure au cours de laquelle des formes bactériennes normales ont été obtenues en partant de filtrats de coquillages. La notion de bactéries filtrables dans le milieu marin est maintenant démontrée. Ces recherches confirment celles antérieures d'Hauduroy.

Dans l'étude actuelle, les auteurs se livrent à des épreuves inverses : ils partent de bactéries phytopathogènes authentiques qu'ils adaptent au milieu marin. Ils suivent les phases de cette transformation qui, pour une bactérie, passe par le stade filtrable. De cette phase filtrable, ils réussissent une réversion en bactérie normale. Ce travail dresse un bilan biochimique, morphologique, antigénique et pathogène des bactéries transformées. Les germes passent par des aspects monstrueux et des images qui ne sont pas sans rappeler les protoplastes et sphéroplastes. Les bactéries ont perdu une partie de leur pouvoir glucidolytique. Enfin, ces germes phytopathogènes, qui s'étaient montrés au départ pathogènes seulement pour *Microtus orcadensis*, sont devenus très virulents pour la souris blanche.

Les caractères biochimiques et antigéniques établissent qu'il n'y a pas eu changement de tribu, ni de genre, mais modification dans l'espèce.

SUMMARY

VITAL CYCLE OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA ADAPTED TO A SEA-WATER ENVIRONMENT.

In a previous experiment, the authors obtained a normal bacterium from filtrates of shell-fishes. The existence of filterable bacteria in sea water is then demonstrated. These findings confirm Hauduroy's previous results.

In the present paper, the authors carry out an inverse experiment : actual phytopathogenic bacteria are adapted to a sea water environment ; for one of them this transformation involves a filterable stage ; from this filterable phase, the authors obtain a reversion to normal bacteria.

The biochemical, morphological antigenic and pathogenic properties of the transformed bacteria are studied. The germs show abnormal forms, which sometimes resemble protoplasts and spheroplasts. The bacteria have partially lost their glucidolytic capacity, and these phytopathogenic germs, which before

the experiment were pathogenic for *Microtus orcadensis* only, became highly virulent for white mice.

The study of the biochemical and antigenic properties shows that the bacteria underwent no change of tribe or genus, but changes of the species.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] HAUDUROY (P.). In Thomas (J. André). *Problèmes d'organisation et de fonctions chez les bactéries et les virus*, 1 vol., Masson édit., Paris, 1958.
 - [2] BRISOU (J.) et CADEILLAN (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **98**, 169.
 - [3] HAUDUROY (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **98**, 909.
 - [4] MANDEL et TULLIO TERRANOVA. *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 1082.
 - [5] Cité par Mc QUILLEN.
 - [6] MAC QUILLEN (K.). *Bacterial protoplasts in : The bacteria* Vol. I, Academic Press, New York et Londres 1960.
 - [7] MAC QUILLEN (K.). *Bioch., Biophys. Acta*, 1950, **5**, 463.
 - [8] BRISOU (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **250**.
 - [9] BRISOU (J.). *Ann. New York Acad. Sci.*, 1960, **79**, art. 10, 488.
 - [10] BILLY. *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 592.
-

EFFET COMPARÉ DE L'ADRÉNALINE ET DU "FACTEUR DÉCHAINANT" SUR LES CULTURES DE *WELCHIA PERFRINGENS*

II. — ESSAIS QUANTITATIFS

par A. CHAGNON (*) et V. FREDETTE (**)

(Département de Bactériologie, Faculté de Médecine,
et Service des Anaérobies, Institut de Microbiologie et d'Hygiène
de l'Université de Montréal, Canada.)

INTRODUCTION.

L'action favorisante bien connue de l'adrénaline dans la gangrène gazeuse spontanée de l'homme aussi bien que dans la gangrène gazeuse expérimentale du cobaye, nous avait incités, récemment, à comparer l'action de cette hormone à l'activité du « facteur déchainant » sur les cultures de *Welchia perfringens* *in vitro* [1].

Nous avons exposé, au cours de ces expériences préliminaires, que le « facteur déchainant » [2], présent dans les filtrats bruts, non toxiques de *Welchia perfringens* (souche SWG) exerce sur ces microorganismes une activité similaire à celle que provoque l'addition d'adrénaline au milieu de culture avant l'ensemencement : cette activité se manifeste par une augmentation rapide de la turbidité à la première demi-heure de croissance.

Il devenait alors intéressant de rechercher s'il y avait équivalence entre l'accroissement turbidimétrique de la croissance à la première demi-heure et les différentes doses de « facteur déchainant » ou d'adrénaline ajoutées.

(*) Cet auteur a bénéficié d'une bourse de l'Office de Recherches Scientifiques, Ministère de l'Industrie et du Commerce, province de Québec, Canada.

(**) Manuscrit reçu le 24 octobre 1960.

TECHNIQUE.

La technique employée a été la même que celle décrite antérieurement [1].

Dans des tubes de 14 x 200 mm, renfermant 8 ml de bouillon Vf frais à pH 7,6-7,8 régénéré et refroidi à 37° C, nous avons ajouté 0,5, 1,0, 1,5 et 2,0 ml de « facteur déchainant » [2] ou d'une solution aqueuse d'adrénaline à 0,001 p. 100 [soit 0,05, 0,10, 0,15 et 0,20 mg/ml] (tableau I). La solution aqueuse d'adrénaline avait été

TABLEAU I. — Influence du « facteur déchainant » et de l'adrénaline sur la croissance de *Welchia perfringens* en bouillon Vf.

	SÉRIES (ml)					
	I	II	III	IV	V	VI
Bouillon VF	8	8	8	8	8	8
Agent stimulant *	0,5	1,0	1,5	2,0		
Eau physiologique	1,5	1,0	0,5		2,0	2,0
Volume final	10	10	10	10	10	10
Inoculum	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0

* L'agent stimulant est soit le « facteur déchainant » (filtrat brut en ml), soit l'adrénaline (solution à 0,001).

préparée quelques heures auparavant et conservée au réfrigérateur ; elle présentait une coloration rose, indice d'une oxydation amorcée.

Tous les tubes ainsi préparés (tableau I) ont alors étéensemencés avec 0,5 ml d'une culture jeune (de 4 à 6 heures) de *Welchia perfringens* (souche SWG) en bouillon Vf. Les tubes de la série V (tableau I) représentent un témoin permettant de juger de la croissance à partir d'un inoculum équivalent à 5 p. 100. Seuls les tubes de la série VI ont étéensemencés avec 1,0 ml de culture jeune : ils présentent un témoin qui permet de juger de la croissance à partir d'un inoculum équivalent à 10 p. 100.

Les tubes ont été désaérés à la machine à vide, scellés et portés au bain-marie à 37° C. La croissance a été suivie par mesure de la turbidité au Klett-Summerson avec l'écran vert (540 mμ).

La turbidité due à l'inoculum lui-même a été mesurée et soustraite des valeurs lues au cours de la croissance. Chaque série de tubes était accompagnée d'un tube-témoin, sans inoculum, pour ajuster l'appareil à zéro.

Les mêmes conditions d'expérience ont servi à l'étude de l'influence de l'addition de quantités croissantes de « facteur déchainant » (0,5,

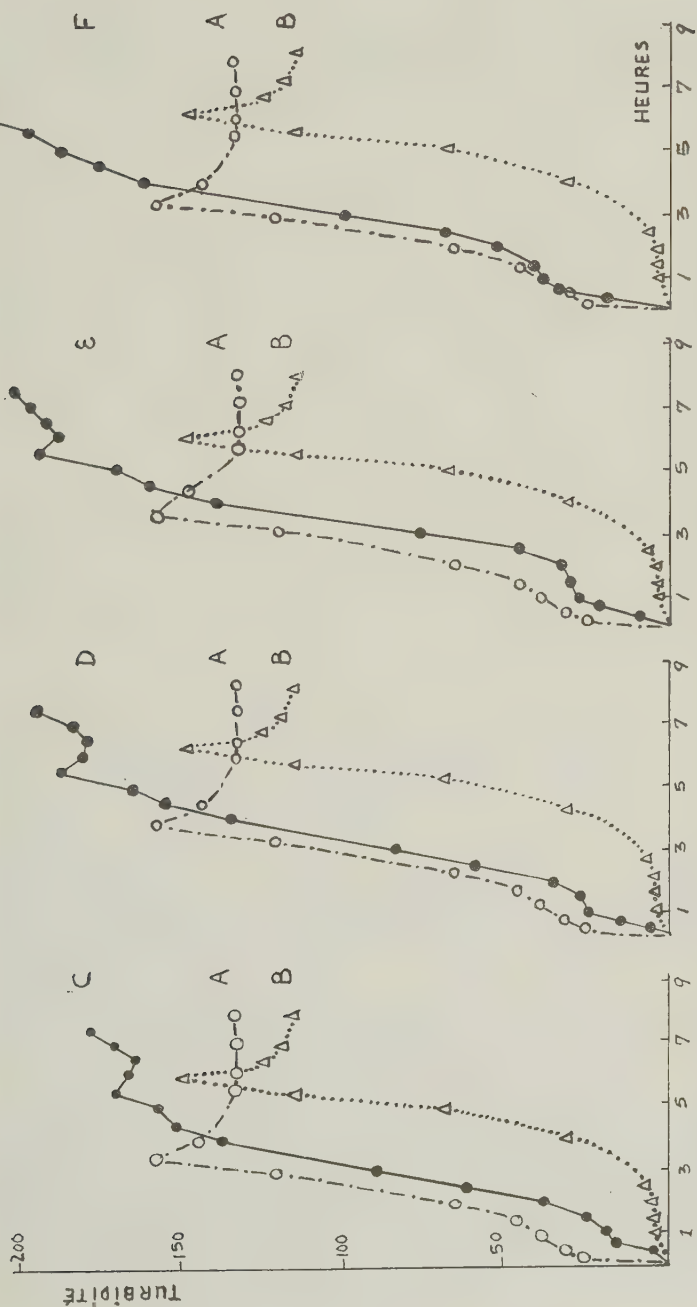


FIG. 1. — Croissance de *W. perfringens* en bouillon V1 : courbe A, croissance normale à partir d'un inoculum équivalent à 10 p. 100 ; courbe B, croissance normale de *W. perfringens* à partir d'un inoculum équivalent à 5 p. 100 ; courbes C, D, E et F, croissance de *W. perfringens* à partir d'un inoculum équivalent à 5 p. 100 en présence de 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml et 2,0 ml de filtrat non toxique renfermant le « facteur déchainant ».

1,0, 1,5 et 2,0 ml). Les filtrats bruts renfermant le « facteur déchainant », contenaient 68,4 mg/ml de matières solides.

A chaque expérience, deux tubes identiques ont été préparés, de sorte que les courbes illustrant les résultats sont basées sur la moyenne des lectures pour les deux tubes en question.

RÉSULTATS.

L'addition de « facteur déchainant » à du bouillon Vfensemencé ultérieurement avec le bacille *IV. perfringens* donne, dès la première demi-heure, une courbe de turbidité modifiée par rapport à la courbe normale de croissance obtenue à partir d'un inoculum comparable. Ainsi, la figure 1 montre qu'en présence du filtrat actif (courbes C, D, E et F) la turbidité marque à ce moment précis une augmentation que l'on ne retrouve dans la courbe normale (courbe B) qu'après une phase de latence de quatre heures environ.

Cette augmentation précoce de la turbidité, provoquée dans ces conditions, correspond cependant à celle obtenue normalement à partir d'un inoculum équivalent à 10 p. 100. Ainsi, en présence de quantités croissantes de « facteur déchainant », nous notons une augmentation parallèle de la turbidité, équivalente à celle obtenue normalement à partir d'un inoculum deux fois plus grand (courbe A).

Si nous considérons les courbes normales de croissance A et B, nous constatons que les maximums de croissance n'apparaissent pas au même moment. C'est d'ailleurs un fait classique. Ainsi, l'apport d'un fort inoculum (courbe A) permet aux bacilles d'entrer immédiatement en phase exponentielle et d'atteindre un maximum en trois heures, tandis que le maximum de croissance obtenu à partir d'un inoculum deux fois plus faible (courbe B) est atteint avec trois heures de retard. La différence en valeurs turbidimétriques, d'ailleurs très faible, peut être attribuée à l'apport d'une plus grande quantité de milieu de culture (en A comparativement à B) au cours du transfert d'un inoculum plus élevé, provenant d'ailleurs d'une culture totale, c'est-à-dire dans laquelle tous les matériaux nutritifs n'ont pas été épuisés.

Quant aux maximums de croissance obtenus en présence de « facteur déchainant », nous constatons qu'ils ne sont pas atteints aussi rapidement qu'en A, bien que la courbe de croissance obtenue dans ces conditions marque une phase exponentielle comparable à celle-ci. Toutefois, ces maximums de croissance s'élèvent progressivement quand on augmente la dose de filtrat actif.

On peut alors se demander si l'augmentation des maximums C, D, E et F est proportionnelle à l'augmentation turbidimétrique observée au début de la croissance, ou si elle est due à l'apport de quantités de plus en plus grandes de produits nutritifs au sein des filtrats bruts.

La figure 2 exprime la valeur de cette hypothèse à l'aide des deux droites (a) et (b) qui y sont tracées conjointement. La droite (a) est obtenue en marquant les valeurs turbidimétriques lues à la première demi-heure de la croissance, en fonction des

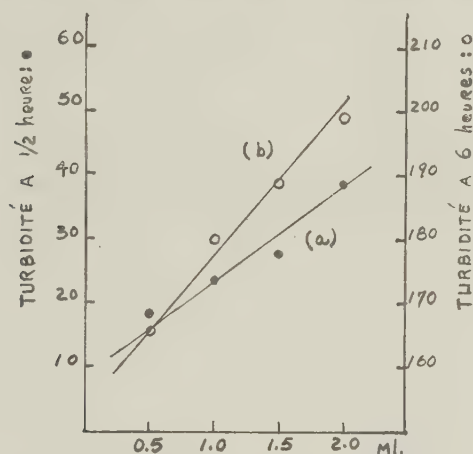


FIG. 2. — Maximums turbidimétriques (échelle de gauche) à la première demi-heure (courbe a) et maximums de croissance (échelle de droite) à 6 heures (courbe b) en fonction des doses de filtrat non-toxique renfermant le « facteur déchainant ».

doses de filtrat brut, renfermant le « facteur déchainant ». La droite (b) est obtenue en marquant les valeurs turbidimétriques lues à la sixième heure de la croissance, en fonction des mêmes doses de filtrat.

Nous constatons que ces deux droites n'ont pas la même pente, indiquant par là que l'augmentation des maximums de croissance est plus grande que celle due à la première demi-heure de croissance. Il semble donc que l'apport de plus en plus grand des produits non épuisés du milieu de culture, et contaminants du « facteur déchainant », au sein du filtrat brut, soit responsable en partie, de l'augmentation progressive des maximums de croissance obtenus en présence du « facteur déchainant ».

Voyons maintenant quelle est l'influence de l'addition de doses croissantes d'adrénaline dans des conditions comparables.



FIG. 3. — Croissance de *W. perfringens* en bouillon VI : courbe A, croissance normale à partir d'un inoculum équivalent à 10 p. 100 ; courbe B, croissance normale à partir d'un inoculum équivalent à 5 p. 100 ; courbes C, D, E et F, croissance à partir d'un inoculum équivalent à 5 p. 100 en présence de 0,05 mg, 0,1 mg, 0,15 mg et 0,2 mg d'adrénaline (solution légèrement oxydée : coloration rose).

L'addition d'adrénaline à du bouillon Vfensemencé ultérieurement avec *W. perfringens* donne une courbe turbidimétrique modifiée dès la première demi-heure, par rapport à la courbe normale, pour un même inoculum. Ainsi, la figure 3 montre qu'en présence d'adrénaline (courbes C, D, E et F), la turbidité marque dès ce moment une augmentation que l'on ne retrouve dans la courbe normale (courbe B) qu'après une phase de latence de quatre heures environ.

Mais, contrairement à ce qui se passe en présence de « facteur déchainant », l'emploi de fortes doses d'adrénaline (même si la solution est légèrement oxydée) ne permet pas aux bacilles d'atteindre leur maximum de croissance (courbes E et F); il semble donc qu'il y ait inhibition de la croissance dans ces conditions.

Ces faits rappellent les résultats que nous avons obtenus antérieurement [4] quand nous avons étudié l'influence de l'addition d'une solution fraîchement préparée d'adrénaline (forme réduite) sur des cultures semblables. Aussi nous croyons que les résultats obtenus en E et F (fig. 3) peuvent être attribués à la présence d'une trop grande proportion d'adrénaline sous forme réduite dans les solutions les plus concentrées.

DISCUSSION.

Les maximums de croissance obtenus en présence d'adrénaline employée aux plus faibles concentrations (courbes C et D) ne sont pas aussi élevés que ceux obtenus dans les croissances normales A et B. Ces faits peuvent paraître contradictoires avec les observations que nous avons rapportées plus haut en présence de « facteur déchainant ». Mais nous avons également démontré que l'obtention d'un plus haut maximum de croissance en présence de « facteur déchainant » peut être attribuée à l'apport de produits contaminants au sein du filtrat. En conséquence, il est permis de penser que cette différence entre l'adrénaline et le « facteur déchainant » est probablement due au fait que l'hormone est une substance chimique pure, alors que le « facteur déchainant » ne l'est pas.

L'emploi de « facteur déchainant » purifié jettera sans doute plus de lumière sur ce problème, qui fera d'ailleurs l'objet d'un travail ultérieur.

En ce qui concerne l'intérêt particulier du présent mémoire, soulignons qu'il confirme l'analogie d'action, déjà constatée antérieurement, entre le « facteur déchainant » et l'adrénaline sur les cultures de *Welchia perfringens*. C'est plus qu'une observation empirique puisque, désormais, nous sommes en mesure de

l'exprimer quantitativement. Ainsi la figure 4 montre qu'en marquant les points des valeurs turbidimétriques obtenues à la première demi-heure de croissance, en fonction des doses d'adrénaline (a) ou de « facteur déchainant » (b), on obtient deux droites de pente identique.

Enfin, il est intéressant de noter qu'à la lumière de ces expériences, il serait possible de doser le « facteur déchainant » *in vitro*, ce qui apporterait un avantage économique considérable,

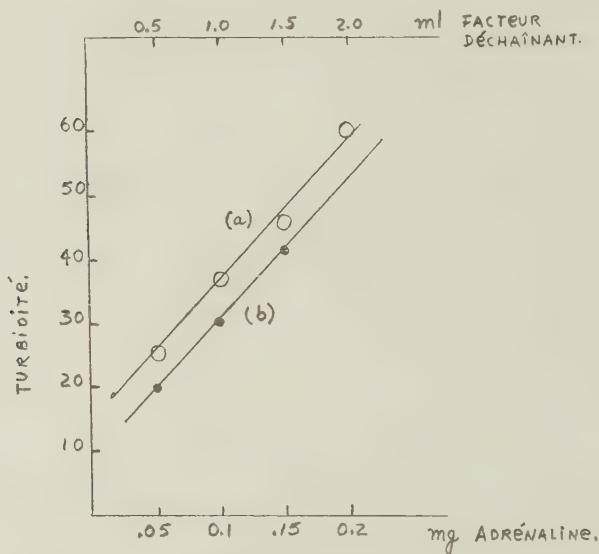


FIG. 4. — Activité comparée de différentes concentrations de « facteur déchainant » (courbe b) ou d'adrénaline (courbe a) sur les cultures de *Welchia perfringens* en bouillon Vf.

étant donné que le dosage du filtrat actif ne peut être réalisé, actuellement, que chez l'animal. De même, il serait aussi possible de doser l'adrénaline par voie microbiologique.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION.

L'addition de quantités croissantes de « facteur déchainant » ou d'adrénaline au bouillon Vf, immédiatement avant l'ensemencement de *Welchia perfringens*, provoque une augmentation parallèle de la turbidité à la première demi-heure.

Ces relations quantitatives non seulement confirment l'analogie d'action constatée antérieurement entre ces deux produits natu-

rels, mais elles ouvrent la voie, d'une part au dosage microbiologique de l'adrénaline, d'autre part, au dosage *in vitro* du « facteur déchainant ».

SUMMARY

COMPARATIVE EFFECT OF ADRENALIN AND « BURSTING FACTOR »
ON CULTURES OF *Welchia perfringens*.

II. QUANTITATIVE TESTS.

Increasing doses of « bursting factor » or adrenalin added to broth seeded with *Welchia perfringens* in tubes sealed under vacuum produce a proportionally increased turbidity in the first half-hour of growth.

These results bear out our previous assertion concerning an identity of action between adrenalin and « bursting factor » upon the growth of *Welchia perfringens* in Vf broth and point to the possibility of titrating adrenalin by a microbiological method and « bursting factor » by an *in vitro* test.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CHAGNON (A.) et FREDETTE (V.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 261-266.
 - [2] FREDETTE (V.) et FRAPPIER (A.). *Rev. Canad. Biol.*, 1946, **5**, 436-441.
-

CARACTÈRES ÉVOLUTIFS ET PERMANENTS DE CELLULES D'HOMME ET DE LAPIN AU COURS DE LEUR ADAPTATION A LA VIE *IN VITRO* (*)

par Georges BARSKI, Francine CORNEFERT et June L. BIEDLER (**).

(*Institut Gustave-Roussy, Laboratoire de Culture de Tissus
et de Virologie, Villejuif [Seine]*).

Grâce au progrès des techniques de maniement et de nutrition des tissus animaux cultivés *in vitro*, la pratique d'obtention de souches cellulaires permanentes adaptées à la vie *in vitro*, s'est considérablement développée. De même, nos connaissances relatives aux modalités de ce processus adaptatif se sont élargies.

Nous savons que les tissus explantés *in vitro* font apparaître d'abord une prolifération cellulaire considérable, accompagnée d'une différenciation morphologique et fonctionnelle, mais, qu'à partir du deuxième ou troisième mois de culture, le taux de cette prolifération a tendance à baisser, souvent jusqu'à l'arrêt complet des divisions cellulaires. Ceci conduit habituellement, à plus ou moins long terme, à la disparition de la culture.

Ce phénomène se produit indépendamment de la nature du tissu cultivé : embryonnaire ou adulte, normale ou cancéreuse.

Cependant, en cette période de stagnation, il arrive qu'apparaissent des groupes de cellules éparses ou en foyers, qui semblent être mieux adaptées aux conditions de la culture. Ces cellules qui peuvent parfois se distinguer de l'ensemble de la population par leur morphologie, finissent par dominer la culture.

L'étude des chromosomes, au cours de ces transformations, démontre que ce processus peut être doublé d'une évolution du caryotype et que souvent [1, 2, 31] mais non toujours [25], elle correspond à une polyploïdisation d'abord, puis à une stabilisation des nombres chromosomiques autour de valeurs hypotétraploïdes.

(*) Manuscrit reçu le 28 octobre 1960.

(**) Boursière du Sloan Kettering Institute for Cancer Research de New York.

Devant ce processus évolutif habituel qui accompagne l'adaptation des cellules animales à la vie *in vitro*, il devient essentiel d'établir les règles et les limites de cette évolution.

Si on devait juger d'après certaines publications qui se sont multipliées dernièrement, aucune caractéristique propre à l'origine histologique et même à l'origine d'espèce des cellules cultivées *in vitro* ne serait à l'abri des transformations qu'elles subissent en culture.

Ainsi, Mc Culloch et Parker [3, 4], ont décrit une série de lignées cellulaires « altérées » (souches de Toronto) différant de leur tissu d'origine (le tissu normal d'homme et de singe) non seulement par la morphologie et le mode de croissance *in vitro*, mais aussi par une modification flagrante du spectre de sensibilité aux virus : disparition de la sensibilité au virus de la poliomyélite notamment.

Au contraire, Westwood et coll. [5] ont vu leurs cultures de rein de lapin (ERK) se transformer au point de devenir morphologiquement semblables à la souche HeLa et aussi sensibles que cette dernière au virus de la poliomyélite. Des observations similaires ont été rapportées par Salk et coll. [6], sur une souche de myocarde de singe devenue semblable aux cellules HeLa, par de Brion et Gruet [7] et dernièrement par Le Quan Sang et Maurin [8], qui ont décrit des souches provenant respectivement de rein de veau et d'exsudat péritonéal de lapin, lesquelles, parallèlement à leur transformation morphologique vers un type cellulaire épithélioïde, devenaient réceptives au virus poliomyélique.

Cependant, à plusieurs reprises, une analyse antigénique et génétique rigoureuse de ces souches « altérées », a pu révéler que ce qui a été considéré comme transformation n'était en fait que la suite de contamination de la culture de base par une autre souche cellulaire qui a supplanté les cellules d'origine. Ainsi, il a été établi par Rothfels et coll. [9], par l'étude des chromosomes et par le procédé des greffes, que les souches de Toronto, supposées humaines ou simiennes provenaient en réalité d'une contamination par la souche L (souris) de Earle. Les mêmes auteurs ont identifié à l'aide de procédés similaires, la lignée de Salk comme provenant très probablement de la souche HeLa. Par ailleurs Syverton et coll. [10] ont apporté des preuves que la souche ERK de Westwood, prétendue de lapin, mais sensible à la poliomyélite, présentait les caractères chromosomiques et antigéniques typiquement humains.

Devant ces faits, nous avons entrepris d'établir deux lignées cellulaires issues d'un tissu anatomiquement le même, les trompes de Fallope, mais provenant de deux espèces différentes : l'homme

et le lapin, de suivre leur évolution *in vitro* et de déterminer les directions et les limites de leur transformation sur le plan de la morphologie cellulaire, du caryotype, des propriétés antigéniques et du spectre de sensibilité virale.

Ce faisant, nous nous sommes entourés de toutes les précautions nécessaires contre des éventuelles contaminations cellulaires intersouches.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Les cultures de départ ont été établies par explantation de fragments de pavillons de trompes utérines selon les méthodes habituelles, sur les parois de tubes aplatis, en plasma de poulet coagulé avec de l'extrait embryonnaire. Les milieux utilisés à base d'hydrolysate de lactalbumine [42] ou de caséine [43] contenaient 10 à 15 p. 100 de sérum soit homologue, soit de cheval. Les transplantations s'effectuaient du premier passage par trypsination selon la méthode classique de Youngner [44], avec une solution de trypsine à 0,05 p. 100 et transfert des suspensions cellulaires qu'on établissait directement à la surface du verre, d'abord dans des tubes, puis dans des flacons.

Tout au long de ces cultures, depuis leur établissement en 1958, afin d'exclure toute possibilité d'intrusion de cellules étrangères, nous avons respecté les règles suivantes : le sérum devant servir à la préparation des milieux de culture était filtré sur filtre Seitz ; nous avons évité de manipuler dans le même compartiment de culture, plus d'une souche à la fois ; enfin, les milieux destinés à l'entretien des différentes souches étaient préparés dans des récipients à part, même quand il s'agissait de milieux de composition identique.

Pour l'étude des chromosomes, nous avons employé la méthode classique de Levan [45] : traitement des cultures sur lamelles pendant deux heures avec une solution de colchicine à 0,5 $\mu\text{g/ml}$, transfert dans une solution saline hypotonique, fixation et coloration dans un mélange d'acide acétique-orcéine, écrasement sous contrôle microscopique, montage sans déshydratation.

Nous avons préparé le sérum spécifique anti-cellules humaines en injectant aux lapins par voie intrapéritonéale, une suspension de 100 mg de cellules HeLa, à raison de deux injections par semaine pendant trois semaines, suivie d'une injection de rappel et d'une saignée huit jours plus tard.

Le sérum spécifique anti-lapin a été obtenu d'une façon analogue sur des coqs injectés avec une suspension de cellules rénales fraîches de lapin.

Pour tester la sensibilité de souches cellulaires au virus, nous avons utilisé 20 souches virales différentes : les souches de poliomyélite (type 1 « Mah » et « Sabin », type 2 « Linden » et « MEF », type 3 « Sauk »), 9 différentes souches de virus entériques humains ECHO (types 1-Farouk, 2-Cornelis, 3-Morrissey, 4-Pesaseck, 5-Noyce, 7-Wallace, 8-Bryson, 10-Lang, 11-Gregory) provenant du laboratoire du Dr Albert Sabin, le virus Coxsackie B3 obtenu du Dr Gilbert Dalldorf, la souche Mengo du virus d'encéphalomyélite de souris, provenant du laboratoire

d'Entebbe (Uganda), le virus d'herpès étant le 110^e passage *in vitro* de la souche « 5433 » de l'Institut Pasteur, le virus de la rhinotrachéite infectieuse des bovins (RIB) envoyé par le Dr Cabasso, la souche de la vaccine adaptée à la culture *in vitro* et provenant de la souche du Lister Institute de Londres, enfin la souche d'adénovirus de type 1 Ad71, fournie par le Dr Huebner de Bethesda.

RÉSULTATS.

Etablissement des souches.

Les trompes humaines provenaient d'une hystérectomie totale chez une femme de 48 ans, opérée pour un fibrome de malignité non déterminée ; les trompes et leur pavillon se sont révélés à l'examen histologique, normaux et exempts de tout élément néoplasique.

Les fragments du pavillon de la trompe, après explantation *in vitro* (février 1958), dans un milieu complété avec un mélange de sérum placentaire humain et de sérum de cheval, manifestaient pendant quarante jours une activité vibratile des cils ainsi qu'une croissance mixte fibroblastique et épithéliale.

Vers le début du troisième mois, après une période de stagnation, on a observé dans la zone d'excroissance de la culture, des foyers de prolifération. Des cellules récoltées à partir de cette zone ont pu être transplantées dans un autre tube, puis repiquées en série par trypsination.

Au bout de cinq mois de culture et six passages, la souche cellulaire ainsi obtenue (désignée TG) était composée de cellules aux formes surtout polygonales ou allongées (pl. I, fig. 1), avec membranes ondulantes discrètes mais régulièrement présentes.

Ces cellules manifestaient cependant de plus en plus une tendance à produire des nappes épithéliales (pl. I, fig. 2). La rapidité de multiplication augmentait au fur et à mesure des passages et au bout d'une année, le taux d'accroissement de population cellulaire s'est stabilisé et équivalait à une augmentation de 10 fois en sept jours.

Des fragments de pavillon de trompes de Fallope, provenant d'une lapine de la race fauve de Bourgogne, d'un an environ, ont été explantés au mois de septembre 1958, dans des conditions analogues à celles décrites précédemment, sauf que le milieu de culture contenait d'emblée le sérum hétérologue (cheval) et était additionné de 2 p. 100 d'extrait embryonnaire de bovin.

Le mouvement vibratil des cils se maintenait pendant environ un mois. En même temps, une abondante excroissance mixte, épithéliale et fibroblastique, s'étendait à partir des fragments. Le cinquante-quatrième jour après explantation, la culture a été trypsinée. La suspension obtenue s'étant bien attachée directement

sur la paroi de verre, nous avons continué à la transférer de la même manière tous les vingt à trente jours, en doublant chaque fois l'étendue de la culture.

Cependant, vers le début du quatrième mois, l'état de cette culture s'est détérioré très considérablement et la reprise s'est effectuée à partir de rares foyers de cellules qui ont survécu à la dégénérescence quasi totale.

Depuis ce rétablissement, la souche (dénommée TL) s'est stabilisée et ses caractéristiques sont restées dans l'ensemble inchangées jusqu'à ce jour. Elle est composée de cellules fusiformes ou polygonales très bien étalées et minces, ayant une tendance plus prononcée que la souche humaine TG à former des enchevêtrements ou des agglomérations typiquement fibroblastiques et une moindre tendance à se constituer en nappes épithélioïdes. Le taux de multiplication de cette souche est de trois fois environ en sept jours.

Etude des chromosomes

L'étude des chromosomes de la souche humaine TG (45 analyses détaillées) a montré un nombre modal de 59 chromosomes avec variations surtout entre les valeurs 56 et 64. Sept à neuf de ces chromosomes étaient des télocentriques vrais et 4 à 9 possédaient un centromère presque terminal.

En outre, nous avons relevé un chromosome subterminal particulièrement long et qui semble être caractéristique de cette souche ; nous ne l'avons pas trouvé dans la souche HeLa cultivée dans notre laboratoire. Aucun changement notable n'est intervenu dans le caryotype de cette souche entre le mois de mai 1959 et le mois de mars 1960.

L'analyse détaillée de 20 mitoses de la souche TL, effectuée au mois de mars 1960, a révélé un nombre moyen de 89 chromosomes, avec dispersion entre 83 et 94 et un nombre modal de 88.

Sur un total de 200 métaphases observées on en a trouvé 94 p. 100 présentant des nombres de chromosomes de cet ordre ; 3 p. 100 à valeurs proches des diploïdes et 3 p. 100 d'approximativement octoploïdes. Dans les mitoses types, c'est-à-dire à valeurs tétraploïdes ou presque, on comptait de 15 à 29 télocentriques, leur nombre modal étant 20.

PLANCHE I.

FIG. 1. — Culture primaire de trompes de Fallope humaines trois semaines après établissement (Gross. 320 $\times$).

FIG. 2. — Aspect de la souche TG après seize mois de culture *in vitro* (Gross. 320 $\times$).

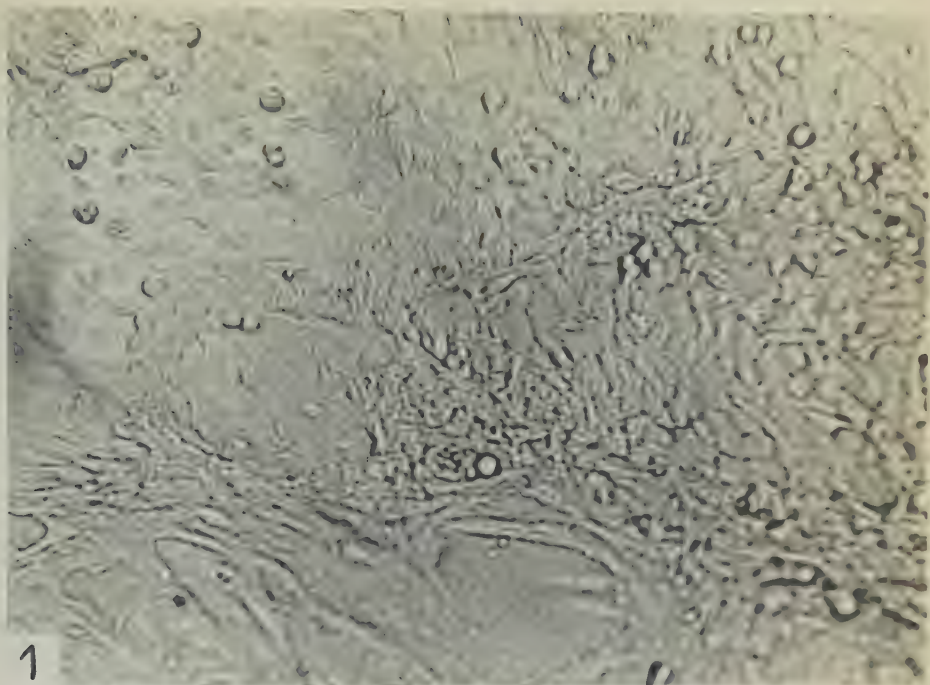


PLANCHE I.

PLANCHE II.

FIG. 3. — Cellules de la souche TG en présence d'immunsérum anti-cellules humaines (Gross. 320 $\times$).

FIG. 4. — Aspect de la souche TL après vingt-quatre mois de culture *in vitro* (Gross. 320 $\times$).

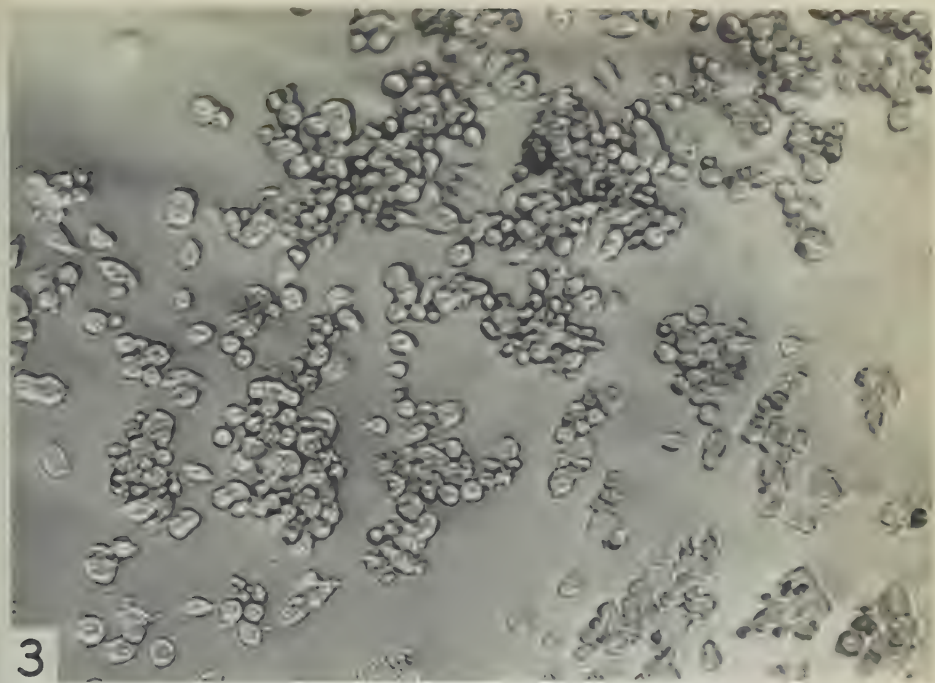
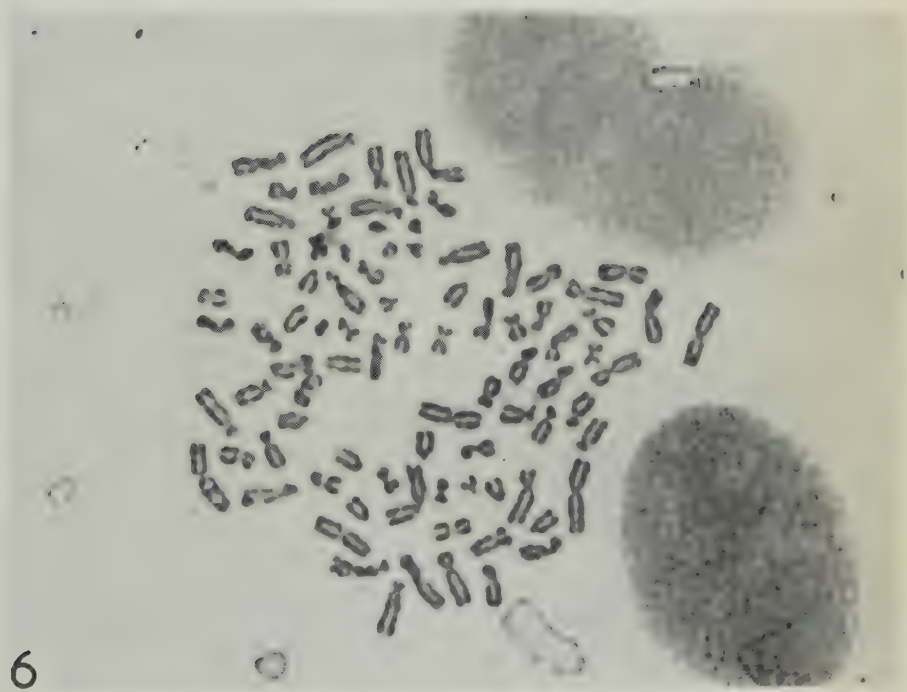
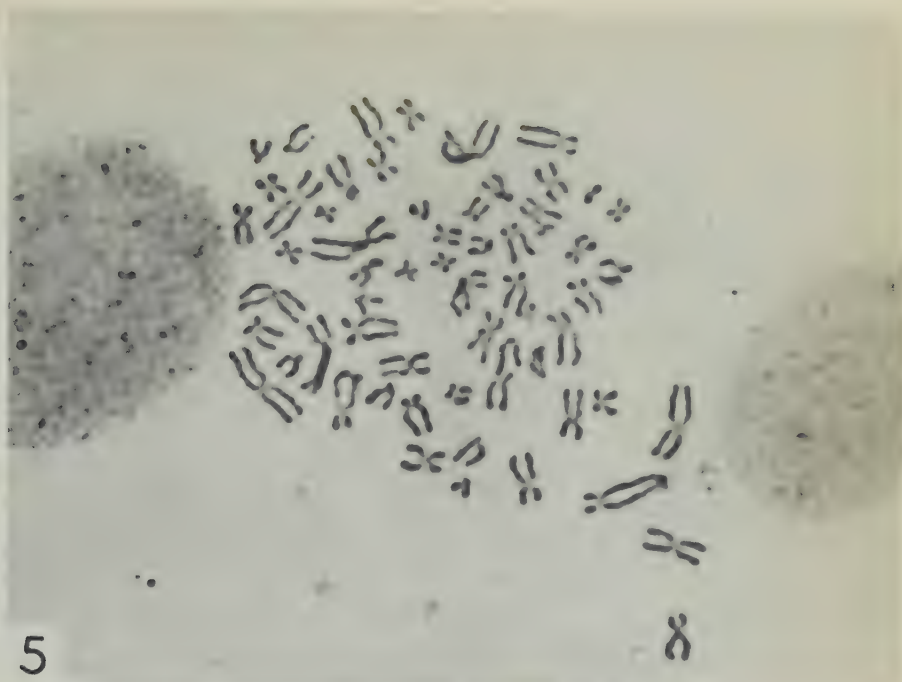


PLANCHE III.

FIG. 5. — Chromosomes de la souche humaine TG. 61 chromosomes, dont 8 à 9 télacentriques ou quasi-terminaux (Gross. env. 3 000 $\times$).

FIG. 6. — Chromosomes de la souche de lapin TL. 87 chromosomes, dont 17 à 18 télacentriques (Gross. env. 3 000 $\times$).



Propriétés antigéniques et greffes.

Un sérum anti-cellules humaines, provenant d'un lapin hyper-immunisé avec les cellules HeLa, chauffé pendant une heure à 56° C et additionné de complément frais de cobaye, exerçait une forte action cytotoxique sur les cellules TG aux dilutions 1/10 et 1/20. Le même sérum n'avait aucun effet sur les cellules TL. En revanche, les cellules de la souche TL mises dans les mêmes conditions en présence d'un sérum anti-lapin obtenu sur le coq montraient des signes de souffrance, tandis que les cellules TG restaient intactes.

Les sérums normaux de coq et de lapin étaient sans action sur les deux souches cellulaires.

Vingt mois après son établissement *in vitro*, nous avons greffé la souche TL à quatre jeunes lapins (6 mois environ) de la race fauve de Bourgogne, non consanguine, en inoculant à chacun 10 millions de cellules par voie sous-cutanée.

Nous avons observé chez trois de ces lapins des nodules à l'endroit de l'injection, qui augmentaient de taille jusqu'au huitième-neuvième jour, mais ont graduellement régressé par la suite.

Des greffes analogues de la souche TG effectuées dans les mêmes conditions sont restées négatives.

Sensibilité aux virus.

Les conditions de l'épreuve étaient les suivantes : les cultures cellulaires, en tubes aplatis, contenant chacune $2 \text{ à } 3 \times 10^5$ cellules, ont été exposées pendant trente minutes à 37° C, à 0,1 ml de suspension virale stock non diluée, puis complétées avec du milieu nutritif et remises à l'étuve.

Les suspensions virales provenaient, pour les virus de polio-myéélite, les adénovirus et la RIB, des cultures en souche HeLa, pour les entérovirus (ECHO) et le virus de Cocksackie des cultures de cellules rénales de singe, pour le virus Mengo des cultures de tissu embryonnaire de souris, enfin pour la vaccine et l'herpès de culture de cellules de rein de lapin adulte.

Le titre infectieux de ces suspensions virales, pour les cultures cellulaires respectives, variait entre $10^{5,5}$ et 10^7 unités infectantes par millilitre.

Les résultats des épreuves sont résumés dans le tableau I.

Il en découle une identité de sensibilité aux différents virus entre les deux souches humaines ainsi qu'entre les deux diffé-

rentes populations cellulaires en provenance du lapin : cellules du premier passage *in vitro* et d'autres qui ont été cultivées en dehors de l'organisme pendant deux ans.

Cette identité s'étend aux détails : ainsi, si le virus de l'herpès possède une affinité particulière pour les cellules de lapin, il

TABLEAU I.

VIRUS	CULTURES CELLULAIRES			
	HeLa	TG	TL	Rein de lapin, cult. primaire
Polio, type 1 (souche Mah)	++	++	n.e.	o
Polio, type 2 (souche Sabin)	++	++	o	o
Polio, type 2 (souche Linden)	++	++	o	o
Polio, type 2 (souche MEF)	++	n.e.	n.e.	o
Polio, type 3 (souche Sauk)	++	++	o	o
Coxsackie B 3	++	++	n.e.	o
Virus ECHO :				
Grégory, type 11	++	++	o	n.e.
Farouk, type 1	++	++	o	—
Wallace, type 7	++	++	—	—
Lang, type 10	++	++	—	—
Pesasek, type 4	++	++	—	—
Bryson, type 8	++	++	—	—
Cornelis, type 2	++	n.e.	—	—
Noyce, type 5	++	n.e.	—	—
Morrissey, type 3	++	n.e.	—	—
Encéphalomyélite Mengo	++	++	+	+
Herpès	++	++	++	++
RIB	++	n.e.	++	—
Vaccine	++	++	++	++
Adénovirus, type 1 (souche Ad. 71)	++	++	+	+

O : Pas d'effet cytopathogène, ni de multiplication virale ; + : Destruction cellulaire partielle, passages répétés de virus impossibles ; ++ : Effet cytopathogène rapide, passages répétés faciles ; n. e. : Epreuve non effectuée.

* Effet cytopathogène prononcé seulement au premier passage.

le montre aussi bien vis-à-vis de cellules rénales que vis-à-vis de la souche TL, ou si ces deux catégories de cellules ne sont que partiellement sensibles au virus Mengo et aux adénovirus — ce qui se manifeste par un effet cytopathogène partiel ou non transmissible — elles le sont toutes les deux à un degré comparable.

DISCUSSION.

Les fragments de pavillon de trompes de Fallope de la femme ainsi que de la lapine, explantés *in vitro*, produisent une croissance à la fois fibroblastique et épithéliale, cette dernière contenant des îlots de cellules ciliées [16].

Avec l'évolution de la culture, ces deux genres de cellules ont tendance à se confondre, et à la suite de passages successifs, nous aboutissons à des populations cellulaires très uniformes ; cependant la lignée cellulaire TL, originaire des trompes utérines de lapin, présente, en définitive, un caractère beaucoup plus fibroblastique que la TG dérivée de trompes humaines.

Il est intéressant de constater que d'autres auteurs, cultivant différents tissus en provenance du lapin, comme le testicule [17, 18], le muscle [18] ou la moelle osseuse [19], ont également noté la tendance qu'ont les tissus de cette espèce à produire *in vitro* des lignées cellulaires stables d'aspect fibroblastique.

Le contraire se produit habituellement avec les lignées cellulaires humaines qui, même si elles sont d'origine mésenchymateuse, ont tendance à produire une croissance de type épithélial ou épithélioïde.

Comme exemple on pourrait citer les souches de Berman et coll. [20], établies à partir de la moelle osseuse, ou la souche de conjonctive de Chang [21], qui ont toutes évolué vers un type de croissance épithéliale caractéristique.

Nos résultats d'étude de chromosomes de la souche humaine TG permettent des rapprochements avec d'autres observations faites sur le caryotype des cellules humaines lors de leur adaptation à la vie *in vitro*. Le plus souvent, et c'est bien le cas de la souche TG, le nombre de chromosomes se stabilise au niveau de valeurs hypotétraploïdes, comme si ces valeurs correspondaient le mieux à la reproduction continue et rapide des cellules humaines *in vitro*.

Ainsi, parmi cinq souches de cellules tumorales humaines analysées par Levan [4], trois (HS1, HEp2, HEp3) présentent un complément chromosomique variant entre les chiffres 51 et 70. Dans la même catégorie entrent les souches de foie et de conjonctive de Chang, avec 72 à 80 chromosomes, et quatre autres souches humaines étudiées par Defendi et coll. [23], qui ont trouvé partout des caryotypes à 60-80 chromosomes environ.

D'autre part, Chu et Giles [24] ainsi que Tjio et Puck [25], ont établi pour différents clones de la souche HeLa des nombres modaux allant de 72 à 78 chromosomes.

Par rapport à ces dernières données, les chromosomes de la

souche TG (nombre modal 59) se situent au-dessous de ces chiffres et se rapprochent le plus des valeurs trouvées par Defendi et coll. [23] pour la souche de prépuce humain de Leighton [26].

L'accumulation dans la souche TG de 7 à 10 chromosomes télacentriques ou quasi terminaux, correspond bien aux données de Defendi et coll. [23] : 7 à 16 chromosomes télacentriques pour les quatre souches qu'ils ont examinées en détail.

Les données concernant le caryotype normal du lapin, sont rares. D'après Painter [27], le complément normal de cette espèce comporte $2n = 44$ chromosomes, chiffre confirmé par Melander [28] et Clausen (cité par Defendi [23]). Selon ces auteurs, le nombre 44 comprend 8 chromosomes télacentriques.

Dans la souche de trompe de lapin, nous avons trouvé surtout des mitoses à 87-89 chromosomes, c'est-à-dire correspondant assez exactement aux valeurs tétraploïdes.

Cependant, le nombre modal de 20 télacentriques interdit d'admettre une vraie tétraploïdie et fait plutôt penser à un remaniement plus complexe.

Ainsi, les caractéristiques chromosomiques des cellules TL sont très différentes de celles trouvées pour la souche humaine TG, et ceci à tel point qu'il n'y a pas de chevauchement entre ces deux souches, ni pour les chiffres totaux de chromosomes, ni pour la proportion de télacentriques.

Mentionnons enfin que les caryotypes de ces deux souches s'avèrent très différents de ceux de toutes les souches de souris que nous avons cultivées et étudiées dans notre laboratoire [29].

Comme on le voit, la seule analyse du caryotype des souches TG et TL nous a offert un moyen efficace pour confirmer l'authenticité de leur origine d'espèce et exclure une contamination par des cellules hétérologues.

D'autre part, nous n'avons rencontré aucune difficulté pour identifier l'origine des souches TG et TL à l'aide des antisérums spécifiques d'espèce, obtenus avec, comme antigène, soit des cellules cultivées (HeLa), soit des tissus frais (cellules rénales de lapin).

L'effet cytotoxique aux dilutions 1/10 et 1/20 était strictement spécifique et nous n'avons pas observé de réactions croisées.

Egalement nets et révélateurs ont été les résultats des épreuves de sensibilité aux différents virus. La souche TG a reproduit exactement, vis-à-vis des virus de poliomyélite, Coxsackie d'encéphalomyélite Mengo, herpès, rhinotrachéite bovine et les adénovirus, la sensibilité de la souche HeLa.

D'autre part, la souche TL a révélé, vis-à-vis de ces virus, un comportement identique à celui des cellules rénales de lapin en cultures primaires.

Par conséquent, sur l'exemple de deux souches cellulaires de même origine histologique mais en provenance de deux espèces différentes, nous avons pu démontrer qu'au cours de l'adaptation à la vie *in vitro*, les populations cellulaires ont subi chacune une évolution propre, conduisant vers un type cellulaire particulier, relativement uniforme, apparemment stable et très différent de la population cellulaire de départ.

Cependant, malgré la modification profonde de la morphologie des cellules, de leur taux de reproduction et de leur caryotype, certains caractères de base révélés par l'analyse des chromosomes, la recherche d'antigènes d'espèce, ainsi que par les épreuves de sensibilité aux virus, sont restés propres à chacune de ces espèces.

Ces constatations rejoignent celles d'autres auteurs qui ont étudié les transformations de souches cellulaires en culture sous tous ces aspects à la fois [23, 30].

Il serait prématuré d'affirmer que telles sont les limites d'évolution de souches cellulaires *in vitro* et on ne peut pas exclure à l'avance toute possibilité de modification de leur spectre de sensibilité aux virus ou de leurs caractères antigéniques. Au contraire, il faut admettre avec Tjio et Puck [25] que des différences dans le comportement de clones cellulaires particuliers, vis-à-vis d'une infection virale, peuvent se manifester comme ces auteurs l'ont vu pour certains clones de la souche HeLa et le virus de la maladie de Newcastle.

Néanmoins, il semble être à l'heure actuelle bien établi que, dans de nombreux cas, les « transformations » radicales de caractères de souches cellulaires avec renversement de la gamme de sensibilité aux virus n'étaient dues qu'aux contaminations par des cellules hétérologues.

Il faut admettre qu'en culture de tissus, le danger de contamination par cellules est aussi réel que celui d'infections bactériennes ou fongiques, avec cette différence pourtant qu'une contamination cellulaire peut passer parfaitement inaperçue et devient, dans la pratique courante, irrémédiable.

Dans ces conditions, un contrôle rigoureux de l'identité et de l'authenticité des souches cellulaires à l'aide des multiples méthodes dont nous disposons, devient indispensable avant toute conclusion concernant les altérations profondes de leurs propriétés.

RÉSUMÉ.

Deux souches cellulaires ayant une même origine anatomique : les trompes de Fallope, mais provenant de deux espèces différentes : l'homme et le lapin, ont été établies *in vitro* et cultivées pendant deux ans.

L'étude comparative de ces souches a conduit aux constatations suivantes :

1° La souche humaine TG a évolué vers un type cellulaire épithélioïde à multiplication rapide et vers un caryotype hypotétraploïde avec un nombre de chromosomes se situant au-dessous des valeurs moyennes de la souche HeLa.

2° La souche de lapin (TL) s'est stabilisée sous un aspect plus fibroblastique et à un niveau de multiplication moins rapide. Le nombre de ses chromosomes se situe surtout dans la zone tétraploïde.

3° Chacune de ces souches est restée sensible aux immunsérums anti-espèce, sans réactions croisées. Les greffes sur lapin ont confirmé le maintien de cette spécificité d'espèce.

4° Vis-à-vis de 20 virus différents : 3 types de poliomyélite, Cocksackie, herpès, vaccine, 9 virus ECHO, encéphalomyélite Mengo, rhinotrachéite bovine et adénovirus, les souches TG et TL ont gardé les sensibilités de base propres aux cellules de ces deux espèces.

Nous confrontons ces résultats avec les données d'autres auteurs sur les modifications des caractères de souches cellulaires en culture *in vitro*.

Vu le danger et la fréquence de contamination de cultures par cellules hétérologues, nous concluons à la nécessité de vérification d'authenticité d'origine et de transformation de ces souches par des épreuves simultanées, immunologiques, sérologiques et génétiques.

SUMMARY.

PERMANENT AND VARIABLE CHARACTERS OF HUMAN AND RABBIT CELLS DURING ADAPTATION TO CONTINUOUS « *in vitro* » GROWTH.

Two cell strains having the same anatomical but different species origin were developed from human and rabbit Fallopian tubes. After two years of cultivation *in vitro* and a comparative study, the following observations were made :

1° The human strain (TG) stabilized as an epithelial-like, rapidly multiplying cell type characterised by an hypotetraploid karyotype with modal number of chromosomes below average value reported for the HeLa strain.

2° The rabbit line (TL), when stabilized, had a much more fibroblastic appearance and a slower multiplication rate. Its chromosome numbers were found chiefly near tetraploid values

3° Each of the two lines continued to be sensitive to specific

anti-species sera. No cross reactions were noted. Grafts on young rabbits confirmed the species specificity of the two lines.

4° Tests with 20 different strains of : polio, Coxsackie, herpes, vaccinia, 9 types of ECHO, Mengo encephalomyelitis, bovine rhinotracheitis, and adeno viruses, proved that the TG and TL strains maintained their characteristic rabbit and human cells virus sensitivity range.

These results are confronted with other data concerning modification of cell characters during prolonged culture *in vitro*.

The danger of heterologous cell contamination in the laboratory routine is emphasized, as well as the necessity of simultaneous immunological, genetical and virus tests on cell strains under study before any definite conclusion concerning the authenticity of their transformation can be drawn.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LEVAN (A.). *Cancer*, 1956, **9**, 648.
- [2] LEVAN (A.) et BIESELE (J. J.). *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 1958, **2**, 1022.
- [3] MC CULLOCH (E. A.) et PARKER (R. C.). *Canad. Cancer Confer.*, 1957, **2**, 152.
- [4] PARKER (R. C.). *Fourth Intern. Polio. Confer.* Lippincott, Philadelphia., 1958, 257.
- [5] WESTWOOD (J. C. N.), MACPHERSON (T. A.) et TITMUSS (D. H. J.). *Brit. J. exp. Pathol.*, 1957, **38**, 138.
- [6] SALK (J. E.) et WARD (E. N.). *Science*, 1957, **126**, 1338.
- [7] DE BRION (G.) et GRUEST (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 426.
- [8] LE QUAN SANG et MAURIN (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 210.
- [9] ROTHFELS (K. H.), AXELRAD (A. A.), SIMINOVITCH (L.), MC CULLOCH (E. A.) et PARKER (R. C.). *Proc. 3rd. Canad. Cancer Confer.*, 1959, p. 189.
- [10] SYVERTON et coll. (Communication personnelle 1960).
- [11] BARSKI (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 512.
- [12] MELNICK (J. L.) et RIORDAN (J. T.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1952, **81**, 208.
- [13] LÉPINE (P.), SLIZEWICZ (P.), DANIEL (Ph.) et PACCAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **30**, 654.
- [14] YOUNGNER (J. S.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **85**, 202.
- [15] LEVAN (A.) et BIESELE (J. J.). *Ann. N.-Y. Ac. Sci.*, 1958, **71**, 1022.
- [16] BARSKI (G.), CORNEFERT (Fr.) et WALLACE (R. E.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1959, **100**, 407.
- [17] FEVRE (H.). (Communication personnelle).
- [18] HAFF (R. F.) et SWIM (H. E.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1956, **93**, 200.
- [19] GOLDSTEIN (M. N.) et HAVAS (E.). *Proc Soc. exp. Biol.*, 1960, **104**, 75.
- [20] BERMAN (L.) et STULBERG (C. S.). *Blood*, 1958, **13**, 1149.
- [21] CHANG (R. S. M.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954.
- [22] HSU (T. C.). *Tex. Rep. biol. Med.*, 1954, **12**, 833.

- [23] DEFENDI (V.), BILLINGHAM (R. E.), SILVERS (W. K.), MOORHEAD (P.).
J. Nat. Cancer Inst., 1960, **25**, 359.
 - [24] CHU (E. H. Y.) et GILES (N. M.). *J. Nat. Cancer Inst.*, 1958, **20**, 383.
 - [25] TJIO (J. H.) et PUCK (T. T.). *J. exp. Med.*, 1958, **108**, 259.
 - [26] LEIGHTON (J.), KLINE (I.) et ORR (H. C.). *Science*, 1956, **123**, 502.
 - [27] PAINTER (T. S.). Cité d'après MATTHEY (R.). Edit. F. Rouge. Lausanne. 1949.
 - [28] MELANDER (Y.). (Communication personnelle. 1960).
 - [29] BARSKI (G.), BIEDLER (J. L.) et CORNEFERT (Fr.). 1960. (Sous presse).
 - [30] MC LAREN (L. C.) et SYVERTON (J. T.). *J. Immun.*, 1957, **79**, 484.
 - [31] MOORHEAD (P. S.), PALM (J. E.), GWATKIN (R. B.), KOPROWSKI (H.)
et INGENITO (E. F.). *Proc. Am. Ass. Cancer Res.*, 1960, **3**, 130.
-

OBSERVATIONS SUR L'EFFET CYTOPATHOGENE DES MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE (*)

par M. LA PLACA (**) et G. MOSCOVICI (***).

(Department of Pediatrics, Medical School, University of Colorado
et Istituto di Microbiologia dell' Università di Bologna)

L'emploi de la technique de l'hémadsorption [4] pour la mise en évidence des Myxovirus [2] en cultures cellulaires *in vitro* a permis à Chanock et coll. [3] d'isoler deux nouveaux Myxovirus appelés d'abord « hémadsorption » types 1 et 2. Ces deux virus ont été récemment réunis à d'autres souches de Myxovirus pour former le groupe dit des virus *parainfluenzae* [4].

L'effet cytopathogène du virus *parainfluenzae* type 3 a été illustré par McKinney et coll. [5] et pour celui des types 1, 2 et 3 on renvoie le lecteur aux travaux de Chanock et coll. [3, 6]. L'observation des lésions cellulaires pour le virus *parainfluenzae* type 3 (hémadsorption type 1) sur des préparations de cellules fixées et colorées a été réalisée par Marston [7], Chany et coll. [8], Lépine et coll. [9], qui ont employé les souches cellulaires HeLa et KB. Le rein de singe a été employé par Lépine et coll. [9] pour l'étude du virus *parainfluenzae* type 2 (virus CA).

L'objet de ce travail est de décrire de nouvelles observations sur la cytopathologie des virus *parainfluenzae* en cultures cellulaires.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

VIRUS. — Les souches virales suivantes ont été employées :

Parainfluenzae type 1 (hémadsorption type 2) obtenue par le Dr R. M. Chanock (isolement effectué en avril 1958 sur culture de rein de singe ; nombre des passages inconnu).

Parainfluenzae type 2 (virus CA), souche Mang, obtenue par le Dr H. Wenner (cinquième passage sur culture de rein de singe).

(*) Ces recherches ont bénéficié d'une subvention du National Institute of Health, Bethesda, Maryland, Grant n° 2-2848 (RI).

(**) Boursier du C. N. R. du Gouvernement italien.

(***) Manuscrit reçu le 29 octobre 1960.

Parainfluenzae type 3 (hémasorption type 1) isolé à Denver en mars 1960 d'un enfant, au cours d'une épidémie de laryngite striduleuse. La souche prototype est appelée CR/8 et a été employée dans notre étude à son quatrième passage en culture de rein de singe. La souche a été adaptée aux cellules HeLa et employée pour cette étude à son cinquième passage.

CULTURES CELLULAIRES. — Cellules de rein de singe (*M. cynomolgus*) de première explantation, cultivées dans un milieu contenant 95,5 p. 100 de solution de Hanks, 0,5 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine et 4 p. 100 de sérum de veau. La souche HeLa [10] a été aussi utilisée en employant un milieu composé de 90 p. 100 de milieu 199 [11] additionné de 10 p. 100 de sérum de veau.

Lorsque les cultures étaient confluentes, le milieu était éliminé et remplacé par 2 ml de milieu d'entretien ainsi composé : pour le rein de singe, 99,5 p. 100 de solution de Earle et 0,5 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine : pour les cellules HeLa, 100 p. 100 de milieu 199.

INFECTION DES CULTURES ET PRÉPARATIONS HISTOLOGIQUES. — Les cultures ont été infectées avec 500 DL₅₀ pour chaque virus et incubées à 37° C en position horizontale.

Le virus *parainfluenzae* type 1 a été étudié exclusivement en rein de singe, tandis que les types 2 et 3 l'ont été soit en rein de singe, soit en cellules HeLa.

La préparation des cellules fixées, adsorbées sur celloïdine et colorées, a été réalisée suivant la technique d'Enders et Peebles [12].

Les types 2 et 3 ont été examinés à divers intervalles de temps jusqu'à cinq jours après l'infection des cultures.

Le type 1 a été examiné au sixième jour après s'être assuré que les épreuves d'hémasorption et d'héماغglutination étaient positives.

La spécificité des lésions causées par les virus a été établie en ajoutant à toutes les expériences des témoins non inoculés et des cultures où chaque virus était neutralisé par son propre antisérum.

Les lésions induites par le *parainfluenzae* type 2 (CA) n'ont pas été neutralisées par l'antisérum anti-virus simien SV-5 [13].

RÉSULTATS.

« *Myxovirus parainfluenzae* » type 3 (hémasorption type 1)

Sur HeLa. — Nos résultats sont en bon accord avec les observations effectuées par Marston [7], Chany et coll. [8] et Lépine et coll. [9].

L'effet cytopathogène du virus consiste dans la formation de syncytiums multinucléés, arrondis et de dimensions progressivement croissantes, qu'on peut observer dès la dix-huitième heure de l'infection.

L'aspect des syncytiums et leur progression dans le temps suggèrent que le phénomène pourrait être la conséquence de fusions cellulaires qui se font de façon centrifuge à partir d'une cellule primitivement infectée.

Il est difficile de savoir actuellement si la fusion cellulaire est le résultat d'une diffusion de l'infection, ou si elle est provoquée par d'autres substances comme Chany et Cook l'ont suggéré [14].

A la formation du syncytium succède toujours la dégénérescence de sa portion centrale qui semble ne pas avoir un rapport défini avec les dimensions du syncytium lui-même, de sorte que, aux stades plus avancés, la plupart des syncytiums apparaissent réduits à un mince bord entourant un espace vide (pl. I, fig. 1).

Les noyaux des syncytiums ont conservé un aspect normal pendant toute la période d'observation et on n'a pas observé d'inclusions intracytoplasmiques.

Sur rein de singe. — Sur ces cellules, on a observé la formation de syncytiums. Les plages syncytiales ont un aspect plus irrégulier qu'en culture de cellules HeLa (pl. I, fig. 2), elles sont plus rares et leur apparition est plus tardive.

Sur rein de singe d'autre part, on a toujours observé des inclusions intracytoplasmiques d'aspect éosinophile, ayant des formes irrégulières. Aux forts grossissements, elles ont un aspect finement granuleux (pl. I, fig. 3).

« *Myxovirus parainfluenzae* » type 2 (CA).

Sur HeLa. — L'effet cytopathogène est caractérisé, comme celui du type 3, par la formation de syncytiums, qui cependant se distinguent par l'irrégularité des contours, l'absence de rétraction apparaissant dans le centre de la région syncytiale et par la présence, dans les syncytiums mêmes (20 à 30 p. 100 environ), d'inclusions cytoplasmiques, à bords nets, entourées d'un halo clair (pl. II, fig. 4).

On peut noter encore, dans le cytoplasme de la presque totalité des plages syncytiales, la présence de nombreuses granulations fortement acidophiles. Les noyaux paraissent parfaitement normaux.

Sur rein de singe. — Comme Lépine et coll. [9] l'avaient observé, l'effet cytopathogène semble aboutir à la formation de plages syncytiales. Toutefois, à la différence de ce qu'on

observe sur HeLa, tous les syncytiums sont remplis d'inclusions cytoplasmiques, éosinophiles, à bords nets et entourées d'un halo clair (pl. II, fig. 5 et 6).

« *Myxovirus parainfluenzae* » type 1 (hémadsorption type 2).

Sur rein de singe. — Après six jours d'infection, les cultures ne présentaient aucune différence morphologique avec les cultures témoins. Ceci, comme il a été dit plus haut, en dépit du fait que la positivité de l'hémadsorption et la présence d'hémagglutinines dans le liquide de culture démontraient la multiplication et la libération du virus.

L'unique constatation digne d'être décrite était la présence de cellules arrondies dont le noyau présentait des altérations dues sans doute à des phénomènes de chromatolyse (pl. II, fig. 7, 8 et 9).

*Mitoses cellulaires en présence d'inclusions provoquées
par « Myxovirus parainfluenzae » type 2.*

Au cours de l'étude de la cytopathologie du type 3 sur culture de rein de singe et sur HeLa, et du type 2 sur HeLa, on n'a jamais observé aucune image de mitose à l'intérieur des syncytiums mêmes, bien que des mitoses typiques aient été très fréquentes dans toutes les préparations examinées.

Toutefois, dans le cas des cellules de rein de singe infectées avec le type 2, le nombre de mitoses en relation avec la présence des inclusions cytoplasmiques a été grand, soit dans les cellules isolées, soit, moins souvent, dans les cellules faisant déjà partie d'une plaque syncytiale (pl. III, fig. 10, 11, 12 et 13).

DISCUSSION.

La première donnée que suggèrent nos résultats, c'est la différence de l'effet cytopathogène des virus *parainfluenzae* types 2 et 3 étudiés respectivement sur cultures cellulaires HeLa et de rein de singe.

PLANCHE I.

FIG. 1. — *Myxovirus parainfluenzae* type 3 en HeLa au cinquième jour de l'infection H. et E. × 150.

FIG. 2. — *Myxovirus parainfluenzae* type 3 en culture de rein de singe au cinquième jour de l'infection. Large plaque syncytiale. H. et E. × 80.

FIG. 3. — *Myxovirus parainfluenza* type 3 en culture de rein de singe au cinquième jour de l'infection. Inclusions intracytoplasmiques. Les petites masses rondes sont des globules rouges de cobaye. H. et E. × 500.

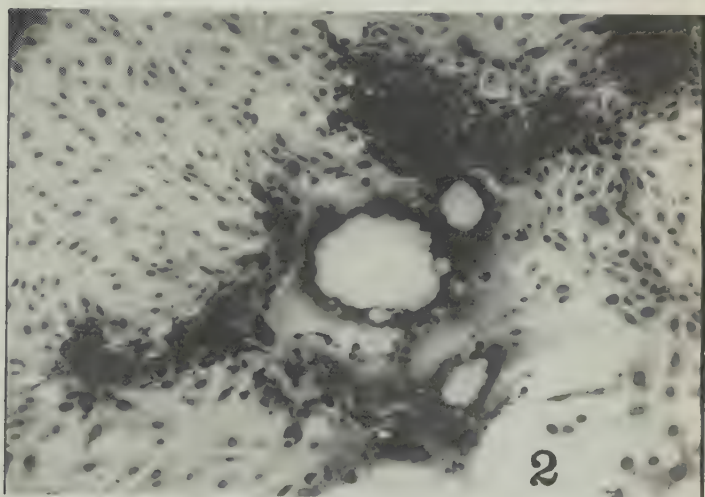
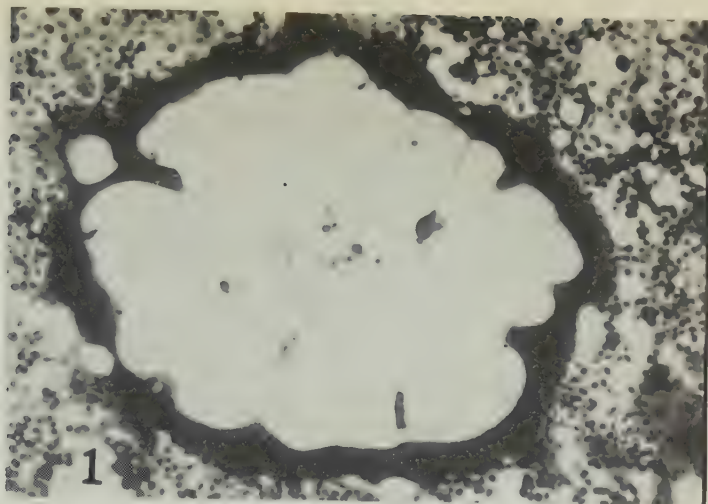


PLANCHE I.

PLANCHE II.

FIG. 4. — *Myxovirus parainfluenzae* type 2 en HeLa au quatrième jour de l'infection. Plaque syncytiale avec inclusions intracytoplasmiques. H. et E. $\times 500$.

FIG. 5. — *Myxovirus parainfluenzae* type 2 en culture de rein de singe au cinquième jour de l'infection. Plages syncytiales avec inclusions cytoplasmiques. H. et E. $\times 80$.

FIG. 6. — *Myxovirus parainfluenzae* type 2 en culture de rein de singe. Détail de la figure 5. $\times 160$.

FIG. 7. — Culture de rein de singe normal. H. et E. $\times 160$.

FIG. 8. — *Myxovirus parainfluenzae* type 1 en culture de rein de singe au sixième jour de l'infection. Noter l'arrondissement des cellules dont la plupart sont entourées par les globules rouges de cobaye. H. et E. $\times 160$.

FIG. 9 — *Myxovirus parainfluenzae* type 1 en culture de rein de singe. Chromatolyse des noyaux. H. et E. $\times 350$.

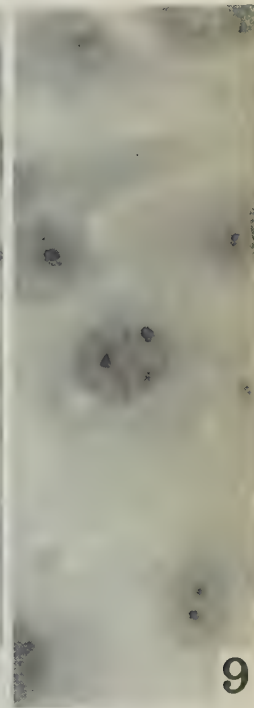
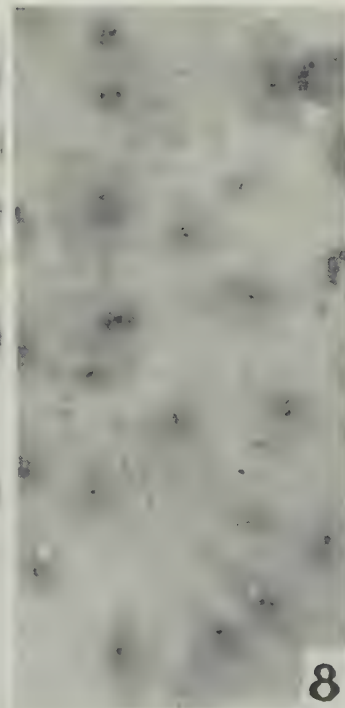
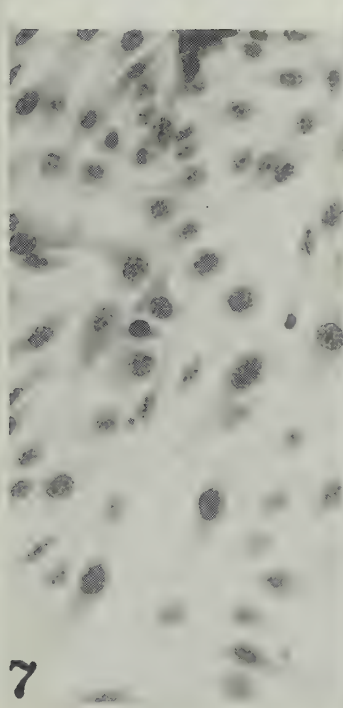
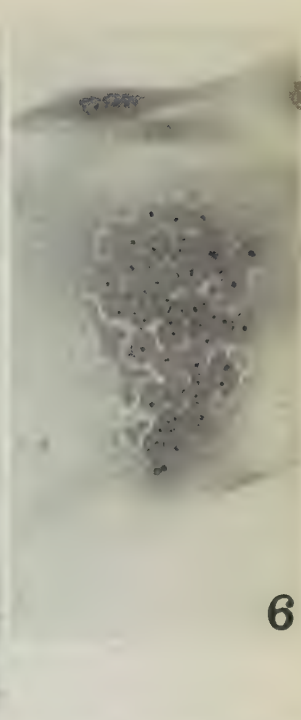
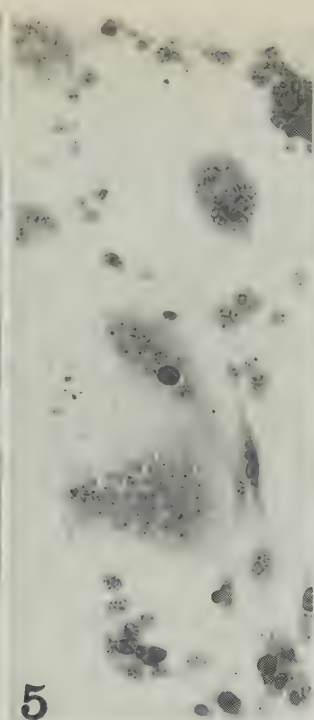


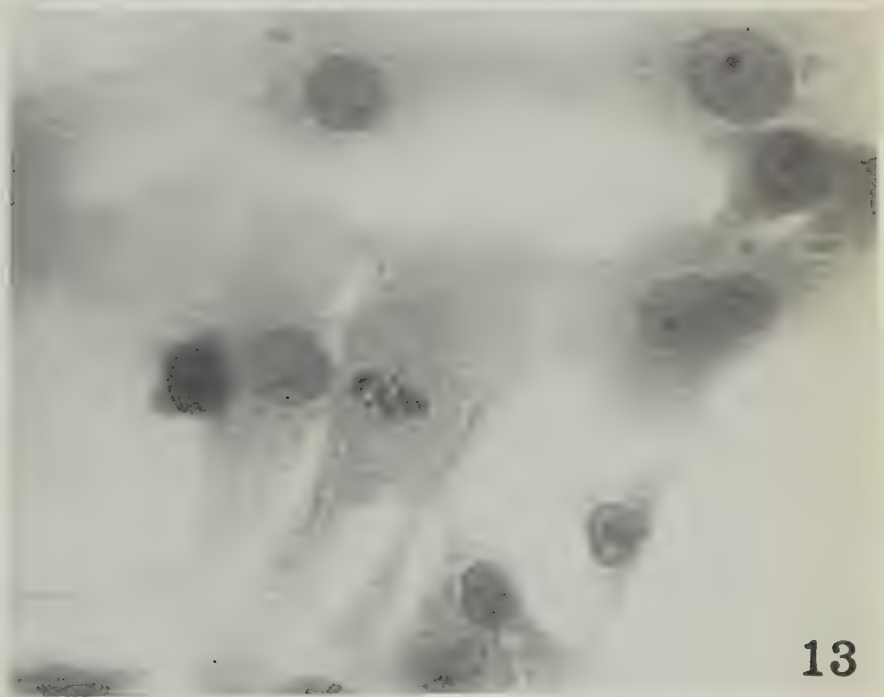
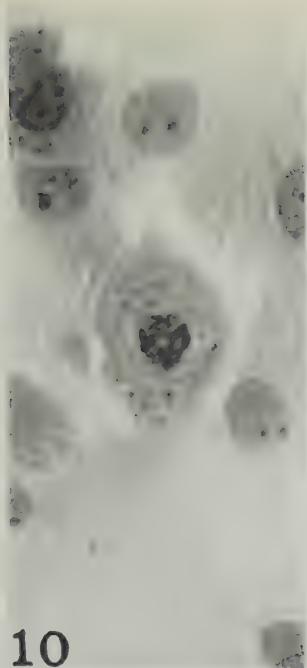
PLANCHE III.

FIG. 10. — *Myxovirus parainfluenzae* type 2 en culture de rein de singe. Métaphase d'une cellule avec inclusions intracytoplasmiques. H. et E. $\times 350$.

FIG. 11. — *Myxovirus parainfluenzae* type 2 en culture de rein de singe. Anaphase d'une cellule avec inclusions intracytoplasmiques. H. et E. $\times 350$.

FIG. 12. — *Myxovirus parainfluenzae* type 2 en culture de rein de singe. Télaphase d'une cellule avec inclusions intracytoplasmiques H. et E. $\times 350$.

FIG. 13. — *Myxovirus parainfluenzae* type 2 en culture de rein de singe. Métaphase d'une cellule avec inclusions intracytoplasmiques et allant faire partie d'une plage syncytiale. H. et E. $\times 380$.



La différence est plus frappante quand on examine les cellules HeLa infectées par le type 3. Celles-ci réagissent par la formation de syncytiums, mais sans formation d'inclusions cytoplasmiques, tandis que sur le rein de singe la réaction s'étend à la formation de plages syncytiales, moins fréquentes que sur HeLa, mais accompagnées de la constante présence d'inclusions cytoplasmiques.

Ces données montrent, encore une fois, la nécessité d'interpréter le mécanisme de l'expression morphologique induite par l'action d'un virus au niveau des cellules sensibles, non seulement en fonction des propriétés du virus même, mais aussi en fonction des possibilités de réaction du système cellulaire employé.

Une autre observation qui nous semble intéressante est la présence des images de mitose en relation avec les inclusions cytoplasmiques provoquées par le virus *parainfluenzae* type 2 sur culture de rein de singe.

De telles observations pourraient faire considérer le virus *parainfluenzae* type 2, tout au moins lorsqu'il est cultivé sur rein de singe, comme un exemple de virus qui possède quelques-unes au moins des propriétés des virus sub-modérés, selon la classification de Dulbecco [15].

En ce qui concerne le virus *parainfluenzae* type 1, l'absence d'effet cytopathogène, bien que le virus se multiplie effectivement, rejoint d'autres exemples nombreux dans la littérature : il suffit de mentionner la multiplication du virus grippal sur membrane chorio-allantoïdienne d'œuf de poule.

Ceci démontre néanmoins que les rapports virus-cellule, dans le cas du type 1, sont très probablement bien différents de ceux qui existent dans le cas des types 2 et 3.

RÉSUMÉ.

La cytopathologie des *Myxovirus parainfluenzae* a été étudiée après infection de deux systèmes cellulaires : HeLa et rein de singe.

Les cellules HeLa infectées par la souche de *parainfluenzae* type 3 montrent une rapide formation de syncytiums sans production d'inclusions intracytoplasmiques ; les cellules de rein de singe infectées avec la même souche virale réagissent d'une façon différente : la formation des syncytiums est moins fréquente, mais s'accompagne presque toujours de l'apparition d'inclusions intracytoplasmiques.

Le virus *parainfluenzae* type 2 provoque dans les deux systèmes cellulaires la formation de plages syncytiales. Toutefois, la présence d'inclusions cytoplasmiques est moins fréquente en HeLa qu'en cellules de rein de singe.

On a observé que la division mitotique n'est pas arrêtée ou supprimée lorsque la cellule de rein de singe est infectée par le virus *parainfluenzae* type 2.

L'infection de cellules de rein de singe par le virus *parainfluenzae* type 1 n'entraîne aucune altération morphologique du système malgré la multiplication et la libération du virus.

SUMMARY

OBSERVATIONS ON THE CYTOPATHOGENIC EFFECT OF *Myxovirus parainfluenzae*.

The cytopathology of *parainfluenzae* viruses has been studied by using two cells systems : HeLa and monkey kidney.

HeLa infected with *parainfluenzae* type 3, have shown a rapid formation of syncytia without cytoplasmic inclusions ; monkey kidney cells however, when infected with the same viral strain, have reacted in a different way, by showing a less marked formation of syncytia where cytoplasmic inclusions could be clearly seen.

Parainfluenzae type 2 lead to the formation of syncytia in both cellular systems. However, the presence of cytoplasmic inclusions is less frequent in HeLa than in monkey kidney cells.

Moreover, mitotic divisions were still observed in monkey kidney cells infected by *parainfluenzae* type 2.

Parainfluenzae type 1 did not cause any morphological alteration to the cell system, despite viral multiplication and release was recorded.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] VOGEL (J.) et SHELOKOV (A.). *Science*, 1957, **126**, 358.
- [2] ANDREWES (C. H.), BANG (F. B.) et BURNET (F. M.). *Virology*, 1955, **1**, 176.
- [3] CHANOCK (R. M.), PARROTT (R. H.), COOK (M. K.), ANDREWS (B. E.), BELL (J. A.), REICHELDERFER (T.), KAPIKIAN (A. Z.), MASTROTA (F. M.) et HUEBNER (R. J.). *New England J. Med.*, 1958, **258**, 207.
- [4] ANDREWES (C. H.), BANG (F. B.), CHANOCK (R. M.) et ZHDANOV (V. M.). *Virology*, 1959, **8**, 129.
- [5] MCKINNEY (R. W.), ENGLAND (B. L.) et FROEDE (S.). *Am. J. Hyg.*, 1959, **70**, 280.
- [6] CHANOCK (R. M.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 555.
- [7] MARSTON (R. Q.). *Proc. Soc. exper. Biol.*, 1958, **98**, 853.
- [8] CHANY (C.), DANIEL (P.), ROBBE-FOSSAT (F.), VIALATTE (J.), LÉPINE (P.) et LELONG (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 721.
- [9] LÉPINE (P.), CHANY (C.), DROZ (B.) et ROBBE-FOSSAT (F.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1959, **81**, 62.

- [10] SCHERER (W. F.), SYVERTON (J. T.) et GEY (G. O.). *J. exp. Med.*, 1953, **97**, 695.
 - [11] MORGAN (J. F.), MORTON (H. J.) et PARKER (R. C.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1950, **73**, 1.
 - [12] ENDERS (J. F.) et PEEBLES (T. C.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **86**, 277.
 - [13] HULL (R. N.), MINNER (J. R.) et SMITH (J. W.). *Am. J. Hyg.*, 1956, **63**, 204.
 - [14] CHANY (C.) et COOK (M. K.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 920.
 - [15] DULBECCO (R.). In *Symposium on latency and masking in viral and rickettsial infections*, Burgess Publ., Co., Minneapolis (U. S. A.), 1958.
-

TOXICITÉ ET VIRULENCE COMPARÉES DES FORMES SMOOTH ET ROUGH DE *SALMONELLA TYPHI* SUR EMBRYON DE POULET

par Monique DIGEON (*) et Marcel RAYNAUD (**)
(avec la collaboration technique de M^{me} Jeanne RIZA).

(Institut Pasteur, Annexe de Garches)

Les formes rough de *S. typhi* sont considérées depuis longtemps comme non pathogènes du fait qu'elles ne sont pas virulentes et que les premières méthodes de préparation des endotoxines n'extraient des bactéries rough que des produits non toxiques. On sait que les formes rough élaborent néanmoins une toxine qui peut être extraite des germes par diverses méthodes [1, 2, 3]. L'endotoxine obtenue provoque chez les animaux une intoxication semblable à celle observée avec l'endotoxine extraite des formes smooth [4]; par contre elle s'en distingue par ses propriétés immunologiques; l'endotoxine extraite des formes rough se montre associée aux antigènes rough [5] communs à de nombreuses bactéries Gram-négatives, celle des formes smooth à l'antigène O spécifique de chaque type.

On pouvait se demander si l'absence de virulence des formes rough, c'est-à-dire leur incapacité de déterminer chez les animaux une infection mortelle, n'était pas liée à la présence dans l'organisme de ceux-ci d'anticorps ou d'un système de défense cellulaire spécifique dirigés contre les antigènes rough communs à de nombreuses bactéries Gram-négatives.

Pour examiner cette question, nous avons utilisé des embryons de poulet, organismes pouvant être considérés comme immunologiquement neufs et dépourvus d'anticorps. On sait que les embryons de poulet sont très facilement infectés et tués par les salmonelles virulentes [6, 7] et qu'ils sont intoxiqués et tués par des préparations d'endotoxine de divers germes smooth [8].

Dans un premier temps, nous avons étudié parallèlement la toxicité pour l'embryon de préparations extraites de formes

(*) Chargée de Recherches à l'Institut national d'Hygiène.

(**) Société Française de Microbiologie, séance du 3 novembre 1960.

smooth et de formes rough de *S. typhi*. Nous avons ensuite recherché le pouvoir infectant des germes *S. typhi* rough comparé à celui des bactéries smooth.

I. — ETUDE DE LA TOXICITÉ.

Les embryons ont été inoculés au dixième jour de l'incubation, âge auquel ils sont le plus sensibles aux endotoxines [8]. Finkels-tein et Ransom [9] ont observé une variation analogue de sensibilité à l'infection par le vibron cholérique. Alors que l'embryon de dix jours est tué par de très faibles doses, de l'ordre de 1 bac-térie, l'embryon de 13 jours est déjà beaucoup moins sensible et l'embryon de 15 jours pratiquement résistant.

Les solutions d'endotoxine utilisées ont été, pour les formes smooth une préparation d'antigène O obtenue selon la méthode de Boivin à partir de bactéries O 901 ; pour les formes rough, soit des extraits bruts (traitement des bactéries R₂ par la solution NaClM/1-citrate M/10 pendant dix-huit heures à 0°, dialyse de l'extrait et lyophilisation), soit des préparations purifiées (précipi-tation par alcool alcalin [10]). Les solutions ont été injectées par voie intraveineuse sous volume de 0,05 ml.

Les embryons meurent moins de vingt-quatre heures après inoculation et présentent des lésions hémorragiques. Les résul-tats obtenus selon les doses, sont portés dans le tableau I. La

TABLEAU I. — Mortalité des embryons inoculés par voie intraveineuse avec différentes préparations d'endotoxine.

DOSES (en µg)	ANTIGÈNE O	TOXINE R ₂ (*)		
		b-46	a-14	a-16
0,005	5/20	—	—	—
0,01	10/20	—	8/20	25/30
0,02	12/16	—	—	20/20
0,05	40/40	18/18	36/40	20/20
0,10	5/5	12/12	20/20	—
0,20	6/6	—	15/15	—

(*) b : extrait brut ; a : préparations purifiées.

toxine R₂ et l'antigène O ont une toxicité équivalente. La DMM est de 0,02 à 0,05 µg, la DM50 de l'ordre de 0,01 µg.

Si on injecte l'endotoxine sur la membrane chorio-allantoïde, il faut des doses beaucoup plus fortes et la mortalité est irrégulière ; certains embryons peuvent résister à 20 µg de toxine.

II. — ETUDE DU POUVOIR INFECTANT.

Les embryons ont été injectés en général au dixième jour d'incubation ; nous en avons aussi inoculé aux septième et huitième jour, mais nous n'avons pas trouvé de différence bien appréciable. Ils ont été inoculés selon trois modes : sur la membrane chorio-allantoïde, par voie intraveineuse et dans le sac vitellin.

Numération des germes. — Le nombre de germes des suspensions à injecter a été déterminé par mesure de la densité optique au photomètre de Klett (écran vert n° 54) après détermination préalable de la densité optique de suspensions numérées à la cellule.

Le nombre de germes vivants a été contrôlé par ensemencement en bouillon macération gélosé en boîtes de Petri et numération des colonies. Pour les bactéries smooth, nous avons obtenu 65 à 75 colonies pour 100 germes comptés par densité optique. Avec les bactéries rough, nous n'avons jamais obtenu un tel nombre. Les suspensions ne nous ont donné que 5 à 30 colonies pour 100 germes comptés par densité optique. Etant donné ces différences, nous donnons les doses injectées en indiquant les deux chiffres. Ces différences tiennent probablement à la tendance des germes rough à rester associés.

Injectations sur la membrane chorio-allantoïde. — Le pouvoir infectant des germes R₂ a été recherché d'abord par la méthode

TABLEAU II. — Mortalité des embryons inoculés avec les germes R₂ sur la membrane chorio-allantoïde.

SUSPENSIONS DE	NOMBRE DE GERMES INOCULÉS DÉTERMINÉ PAR		MORTALITÉ DES EMBRYONS
	Numération des colonies	Densité optique	
Germes vivants	2 à 4	10 à 20	17/36
	10 à 50	100 à 500	10/30
	200 à 300	1 000 à 5 000	24/38
	500 à 600	2 000 à 10 000	30/60
	2 000 à 3 000	20 000	11/20
	10 000	50 à 100 000	11/20
Germes tués par chauffage	500 à 2 000 (*)	5 000 à 20 000	6/30
	10 000 à 20 000	100 à 200 000	3/20
	5 à 10 millions	50 millions	11/30

(*) Numération avant chauffage.

classique d'injection sur la membrane chorio-allantoïde (sous volume de 0,1 ml). Par cette technique, on obtient bien une certaine mortalité des embryons, mais quelles que soient les doses utilisées jusqu'à 10 000 germes vivants les résultats varient de 20 à 80 p. 100, la moyenne se situant aux environs de 50 p. 100 (voir tableau II).

Cette mortalité semble bien due à une infection; la plupart des embryons tués meurent entre le deuxième et le quatrième jour après inoculation et leur liquide allantoïque contient de nombreux germes. D'autre part, pour éliminer l'hypothèse de la mort par intoxication par la toxine des germes, nous avons inoculé des germes tués par chauffage à 100° pendant quinze minutes (voir tableau II). La mortalité est toujours inférieure à celle causée par les germes vivants, même avec une dose de plusieurs millions de germes.

Injections intraveineuses. — Dans ces conditions, les doses supérieures à 1 000 germes vivants inoculés sous volume de 0,05 ml tuent 100 p. 100 des embryons de façon absolument constante. Les doses moins fortes ne donnent pas des résultats aussi réguliers (voir tableau III). La DM50 (log. prob.) est de l'ordre de 60 germes vivants.

TABLEAU III. — Mortalité des embryons inoculés avec les germes R_2 vivants par voie intraveineuse.

	NOMBRE DE GERMES INOCULÉS DÉTERMINÉS PAR		MORTALITÉ DES EMBRYONS
	Numération des colonies	Densité optique	
1 ^{re} série d'expériences	50	625	15/20
	100	1 250	10/17
	500	2 500	17/18
	1 000	5 000 à 20 000	18/20
	2 000	10 000 à 20 000	20/20
DM 50	2 000 à 10 000	10 000 à 100 000	50/50
2 ^e série d'expériences	50	600	
	20	100	9/32
	40	200	11/30
DM 50	80	400	12/32
	60	300	

Nous avons étudié la toxicité des germes R_2 tués par chauffage à 100° pendant quinze minutes, pour contrôler que la mortalité des embryons n'est pas due à une intoxication, mais

TABLEAU IV. — Mortalité des embryons inoculés avec les germes R₂ tués par voie intraveineuse.

NOMBRE DE GERMES INOCULÉS DÉTERMINÉ PAR DENSITÉ OPTIQUE		MORTALITÉ DES EMBRYONS
10 000		2/18
100 000		4/12
500 000		5/12
1 million		9/18
2 —		10/20
4 —		9/10
5 —		15/16
25 —		9/9
DM 50 (log. prob.) : 1 million.		

à une infection (voir tableau IV). La DM50 est au moins deux mille fois plus forte que la DM50 de germes inoculés vivants.

Injections dans le sac de vitellin (1). — Par cette voie, les résultats sont beaucoup plus réguliers et la dose minima infectante beaucoup plus faible (voir tableau V). La DM50 est de l'ordre de l'unité = 1 germe vivant ou 5 germes comptés par densité optique.

TABLEAU V. — Mortalité des embryons inoculés avec les germes R₂ vivants ou avec la toxine R₂ dans le sac vitellin.

NOMBRE DE GERMES INOCULÉS DÉTERMINÉ PAR		MORTALITÉ DES EMBRYONS
Numération des colonies	Densité optique	
1	5	13/24
1	10	18/24
2	10 à 20	70/70
4	20 à 40	58/58
Doses en µg		
Injection de toxine R ₂ (*)	0,05	5/10
	0,10	4/10
	0,50	5/10
	1	8/10
(*) Par voie intraveineuse 0,05 µg de la même préparation (b-46) tue 18/18 embryons.		

(1) Nous remercions M^{me} Grabar, du Service des Vaccins, qui nous a indiqué ce mode d'inoculation pour l'étude de la virulence.

L'injection de 0,1 ml d'une suspension évaluée par lecture photométrique à 50 germes par ml et donnant par ensemencement 10 colonies, tue la moitié des embryons. La plupart des embryons meurent entre dix-huit heures et quarante-huit heures après inoculation.

Nous avons contrôlé l'infection par examen des liquides allantoïque et amniotique prélevés peu après la mort de l'embryon (dilutions, ensemencements et numérations des colonies). Cet examen révèle une abondante multiplication des germes : nous avons trouvé dans ces liquides 100 millions à 1 milliard de germes par ml. Nous avons également vérifié que la sensibilité des embryons à l'endotoxine n'est pas plus grande lorsque celle-ci est injectée dans le sac vitellin. Elle est au contraire plus faible (voir tableau V).

Par ce mode d'inoculation, la dose infectante de germes *R*₂ devient du même ordre de grandeur que celle des salmonelles virulentes [6, 7].

Nous avons comparé le pouvoir infectant des trois formes *S. typhi* rough (souche *R*₂), *S. typhi* smooth W (souche O 901), *S. typhi* smooth V (souche Ty 2 Vi agglutinable, O inagglutinable) en inoculant une dose faible (2 à 10 bactéries) de chacune d'elles selon les modes précédemment étudiés (voir tableau VI).

TABLEAU VI. — Mortalité des embryons inoculés avec les bactéries rough et smooth.

MODE D'INJECTION	BACTÉRIES SMOOTH		ROUGH
	Ty 2	O.901	<i>R</i> ₂
M.C.A. (*)	10/10	5/10	17/36
I.V.	8/10	12/12	4/20
Sac vitellin	—	9/10	20/20
(*) Membrane chorio-allantoïde.			

Dose inoculée : 0,1 ml d'une suspension à 100 germes par millilitre (déterminés par densité optique), dose correspondant à 7 germes viables pour les bactéries smooth et 2 à 4 pour les bactéries rough (déterminés par ensemencements et numération des colonies).

On constate que, inoculés sur la membrane chorio-allantoïde, seuls les germes Vi provoquent l'infection mortelle de tous les embryons. Les germes smooth O 901 semblent, par cette voie, n'être pas plus virulents que les germes rough ; par contre, à l'inverse des germes rough, ils sont aussi virulents que les germes Vi par voie intraveineuse.

CONCLUSIONS.

Stetson [44] a émis l'hypothèse que les réactions des animaux aux endotoxines ne seraient pas des phénomènes toxiques proprement dits, mais seraient des manifestations d'allergie bactérienne, les animaux dits normaux ayant été antérieurement sensibilisés par des bactéries Gram-négatives. Les embryons de poulet pouvant être considérés comme des organismes immunologiquement neufs, non sensibilisés par contact avec des germes, il semble bien que les lésions et la mort soient dues aux propriétés toxiques « primaires » de l'endotoxine.

Les germes rough de *S. typhi*, de même que les souches smooth sans antigène Vi, sont capables, dans certaines conditions, de provoquer, aux mêmes doses que les bactéries avec antigène Vi, une infection mortelle chez les embryons de poulet. Les différences de virulence que l'on peut mettre en évidence par emploi de la voie intraveineuse et de la voie allantoïdienne, ne sont plus perceptibles quand on utilise l'inoculation dans le sac vitellin.

RÉSUMÉ.

Les embryons de poulet au dixième jour d'incubation sont aussi sensibles à l'endotoxine extraite des formes rough de *S. typhi* qu'à celle des formes smooth (DM50 de l'ordre de 0,01 μ g).

Ils sont également très sensibles à l'infection par ces germes. Les bactéries rough (*S. typhi* R₂) sont capables de provoquer, chez 100 p. 100 des embryons, une infection mortelle à la même dose que les bactéries smooth virulentes (*S. typhi* Ty 2), à condition d'être inoculées dans le sac de vitellin. Par voie intraveineuse, on peut infecter 100 p. 100 des embryons avec des doses plus fortes de bactéries R₂, tandis que les bactéries smooth dépourvues d'antigène Vi (*S. typhi* O 901) sont mortelles aux mêmes doses que les bactéries Vi. Inoculées sur la membrane chorio-allantoïde, les bactéries rough tuent irrégulièrement les embryons même à doses très fortes.

SUMMARY.

COMPARATIVE TOXICITY AND VIRULENCE OF SMOOTH AND ROUGH FORMS OF *Salmonella typhi* IN CHICK EMBRYOS.

Chick embryos incubated ten days show the same sensitivity to the endotoxin extracted from R as from S forms of *S. typhi* (DM50 about 0,01 μ g). They are also easily infected with *S. typhi*.

Rough bacteria (*S. typhi* R₂) may provoke a lethal infection in 100 p. 100 of the embryos, like smooth virulent bacteria (*S. typhi* Ty2) in the same dose, if they are injected into the yolk sac. By means of intravenous inoculation of higher doses of R₂ bacteria, 100 p. 100 of the embryos are infected, whereas intravenous inoculation of smooth bacteria deprived of Vi antigen (*S. typhi* O 901) is lethal when carried out with the same doses as Vi bacteria. When inoculated into the chorio-allantoic membrane, rough bacteria kill the embryos irregularly, even when very high doses are used.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] RAYNAUD (M.) et DIGEON (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **229**, 564.
- [2] WESTPHAL (O.), LUDERITZ (O.) et BISTER (F.). *Z. Naturforsch.*, 1952, **7 b**, 148.
- [3] RAYNAUD (M.) et DIGEON (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **251**, 985.
- [4] DIGEON (M.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 642 et 790 ; **93**, 91 et 390.
- [5] DIGEON (M.), MANGALO (R.), TURPIN (A.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 170.
- [6] GRABAR (M^{me} J.) et LE MINOR (M^{me} S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **81**, 528.
- [7] GRABAR (M^{me} J.) et LE MINOR (M^{me} S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 117.
- [8] SMITH (R. T.) et THOMAS (L.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 217.
- [9] FINKELSTEIN (R.) et RANSOM (J.). *J. exp. Med.*, 1960, **112**, 315.
- [10] BIZZINI (B.), DIGEON (M.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 724.
- [11] STETSON (C. A.). *J. exp. Med.*, 1955 **101**, 421.

L'IDENTIFICATION DES MYCOBACTÉRIES PAR L'ÉPREUVE DE RÉDUCTION DES NITRATES

par H. BOISVERT (*).

(Institut Pasteur, Service de la Tuberculose [D^r J. BRETEY])

Parmi les nombreuses méthodes applicables aux Mycobactéries, récemment proposées par les auteurs, nous nous sommes attaché à l'étude des réactions simples, ne nécessitant pas d'appareillage spécial, et qui, cependant, peuvent apporter un élément utile, sinon décisif, pour l'identification de ces germes.

Dans un précédent travail [1] nous avons relaté nos observations sur la recherche du nicotinamide suivant Konno, qui permet de classer d'une part, *M. tuberculosis hominis* et *muris* qui produisent une grande quantité d'acide nicotinique et donnent une réaction qualitative positive, d'autre part, les autres espèces de Mycobactéries et des *Nocardia* qui produisent peu d'acide nicotinique avec une réaction négative ou douteuse.

Virtanen [2], en comparaison avec d'autres méthodes, a fait une étude très complète de la réduction des nitrates. Pour mettre en évidence les nitrites, l'auteur utilise la méthode de Shinn [3]. L'épreuve quantitative montre que toutes les Mycobactéries sont susceptibles de réduire les nitrates mais à des degrés divers. Seules les souches possédant une forte activité réductrice réagissent positivement à la réaction qualitative.

Sur 750 souches de bacilles tuberculeux humains, 742 sont fortement positives, 8 atypiques, de virulence atténuée semblable à celle du BCG sont négatives ;

23 souches bovines et 5 BCG sont négatives ;

5 souches aviaires sur 12 sont positives, ainsi que 22 bacilles dits « atypiques », de groupe non précisé, sur 43.

TECHNIQUE.

La méthode préconisée avait été employée par Bratton et Marshall [4] pour le dosage des sulfamides. Les amines aromatiques donnent naissance en présence de NO_2Na et d' HCl , à un chlorure de diazonium. Celui-ci peut être copulé avec certains réactifs pour former un azoïque

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 novembre 1960.

coloré. Dans la technique de Bratton et Marshall, ce réactif copulant est le chorhydrate de N-(1-naphtyl)éthylène-diamine. En France on utilise le chlorhydrate de naphtyl-diéthyl-propylène-diamine ou réactif IV de Tréfouël [5].

Dans le cas présent on utilise la méthode pour doser les nitrites en présence de sulfanilamide.

La réaction qualitative de Virtanen que nous employons consiste à introduire dans un tube à hémolyse contenant I goutte d'eau distillée pour faciliter le dépôt, une bonne anse de culture sur milieu de Jensen, soit 10 à 15 mg de bacilles.

On verse dans les tubes 2 cm³ d'une solution M/100 de NO₃Na en tampon phosphate M/45 à pH 7 (NO₃Na : 0,085 g ; PO₄H₂K : 0,117 g ; PO₄H Na₂.12 H₂O : 0,485 g ; eau distillée : 100 cm³).

Après deux heures d'incubation à l'étuve à 37° on ajoute dans chaque tube I goutte d'HCl concentré, II gouttes d'une solution de sulfanilamide à 0,2 p. 100, II gouttes de chlorhydrate de N.α-naphtyl-diéthyl-propylènediamine (Prolabo) à 0,1 p. 100. Nous avons substitué ce dernier réactif, après essai, au bichlorhydrate de N-(1-naphtyl)-éthylène-diamine (BDH) utilisé par Virtanen. Cette dernière solution doit être renouvelée toutes les semaines.

Dans les réactions positives le liquide est rouge-violet intense ou présente une coloration moyenne. Dans les réactions négatives le liquide reste incolore, ou l'on observe une légère teinte rosée. Tous les titrages doivent naturellement être accompagnés de témoins.

Observations. — Parfois la culture sur Jensen est pauvre, elle contient bien 10 mg de culture qu'il est évidemment impossible de prélever intégralement. On fait alors directement la réaction dans le tube qui est incubé en position couchée. Dans ce cas il ne faut tenir compte que des réactions positives. Dans les cultures en milieu liquide de Dubos ou de Youmans on introduit, pour 5 cm³, II gouttes d'une solution à 4,25 p. 100 de NO₃Na et, après deux heures d'étuve, III gouttes d'HCl et V gouttes des autres réactifs.

La réaction doit se pratiquer sur des cultures en pleine croissance. Pour les souches de bacille tuberculeux humain, l'intensité de la réaction diminue après un mois.

RÉSULTATS.

Mycobacterium tuberculosis.

M. tuberculosis hominis. — 131 souches étudiées : 21 de collection, d'origine parfois très ancienne, dont deux classées comme avirulentes. 7 souches, relativement récentes, ont subi l'épreuve de virulence comparée lapin-cobaye. 103 souches isolées de l'homme ont été pour la plupart éprouvées vis-à-vis des antibiotiques, 70 sont INH-résistantes.

Toutes ces souches réduisent fortement NO₃Na.

M. tuberculosis bovis. — 50 souches : 10 souches anciennes de collection, eugoniques, rugueuses ; 16 relativement récentes, virulentes pour le lapin, lisses ou en phase intermédiaire, 24 dysgo-

niques lisses, négatives à l'épreuve du nicotinamide. Les souches dysgoniques sont cultivées sur Jensen contenant 0,3 p. 100 d'acide pyruvique ; 48 sont négatives, 2 fortement positives : les souches de collection eugoniques rugueuses BB et LA.

BCG. — 8 souches. Les souches Paris et Moscou sont négatives, la souche Moreau donne une réaction moyenne. Les 5 souches d'origine humaine, isolées en France, sont négatives.

M. tuberculosis muris. — 3 souches, négatives.

M. tuberculosis avium. — 16 souches de collection : 13 sont négatives, 2 donnent une réaction de moyenne intensité, 1 réduit fortement les nitrates.

Bacilles paratuberculeux.

Nous conservons ce nom pour désigner toutes les Mycobactéries n'appartenant pas aux types ci-dessus, le terme « atypique » nous paraissant équivoque. Nous adoptons par ailleurs la classification de Runyon pour les espèces indéterminées.

M. johnei : 2 souches, négatives.

M. ulcerans : 1 souche, négative.

M. chelonae : 1 souche, négative.

Photochromogènes (M. kansasii). 30 souches. 29 proviennent de collections diverses. Nous avons isolé la souche Aaron chez un homme considéré comme tuberculeux pulmonaire et guéri par le traitement habituel. C'est la seule Mycobactérie isolée, une seule fois, chez ce malade.

29 souches réagissent fortement comme le bacille tuberculeux humain, la souche 0735 seule est négative.

Scotochromogènes. 40 souches. 15 proviennent de collections étrangères. De ces 15 souches, 12 sont négatives, 1 moyennement positive, 2 douteuses.

Pour nos 25 souches, 5 sont fortement positives, 2 moyennes, 18 négatives. Soit au total 30 négatives, 2 douteuses, 3 positives moyennes, 5 positives fortes.

Non photochromogènes. 26 souches, dont 2 proviennent de l'extérieur et ne réduisent pas NO_3Na . Nos 24 souches se répartissent en 7 fortement positives, 5 moyennes, 3 douteuses, 9 négatives.

A croissance rapide. 30 souches, 8 appartiennent à des espèces déterminées.

2 *M. phlei*, 3 *M. fortuitum*, 1 *M. smegmatis*, fortement positives, 2 *M. balnei* négatives.

Parmi les souches indéterminées, 19 sont fortement positives, 1 moyenne, 2 négatives.

Nocardia.

Astéroïdes. 3 souches, 2 réduisent fortement les nitrates, la souche Douglas récemment isolée, très virulente, reste négative.

2 souches de *N. brasiliensis* et 3 *N. pelletieri* donnent une réaction forte. 1 *N. rhodocrans* est négative.

DISCUSSION ET CONCLUSION.

Les souches humaines se comportent dans l'épreuve de réduction des nitrates d'une façon homogène ; la souche H37 Rv D, qui ne révèle pas d'acide nicotinique dans la réaction de Konno, est ici parfaitement positive.

En ce qui concerne les souches bovines, négatives, les exceptions concernent uniquement de vieilles souches de collection qui présentent d'autre part une réaction de Konno positive. Par contre, les deux souches Dupray S et Ravenel, positives au Konno, ne produisent pas de nitrites.

Les souches de BCG sont de vieilles souches bovines, la souche Moscou négative produit une quantité assez appréciable de nicotinamide, tandis que la souche Moreau, Konno négative, réduit d'une façon moyenne les nitrates.

Du point de vue pratique, il est intéressant de constater que le BCG-Paris et les souches isolées chez l'homme sont négatives, ce qui facilite l'identification. D'ores et déjà, nous associons à l'inoculation au cobaye l'épreuve de réduction des nitrates, la réaction de Konno et le titrage de la sensibilité à l'hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxylique (TCH) [6].

Le bacille de Wells, que nous rapprochions du bacille humain pour sa forte teneur en acide nicotinique, s'en différencie par son incapacité à réduire les nitrates.

En ce qui concerne les bacilles aviaires, qui ne se distinguent des paratuberculeux non photochromogènes que par leur pouvoir pathogène pour les oiseaux, ils se rapprochent, en effet, de ce groupe dans la réduction des nitrates. Cependant, nous avons observé moins de souches positives que Virtanen : 3 souches positives sur 13, contre 5 positives sur 12.

La réaction des Mycobactéries photochromogènes est remarquable. Elles manifestent la même aptitude que le bacille tuberculeux humain à produire NO_2Na . C'est un élément de plus pour considérer ce groupe comme une espèce. La souche négative

tive O 735, sensible à la streptomycine et aux sulfones (F. Grumbach), est à proprement parler, une souche « atypique » atypique.

Dans l'ensemble, les paratuberculeux scotochromogènes réduisent peu les nitrates : 7 positifs sur 38. La proportion des souches réductrices est plus élevée dans le groupe non photochromogènes :

Les bacilles à croissance rapide sont généralement très positifs : 26 sur 32. Les deux souches indéterminées négatives sont pigmentées en rouge et se rapprochent de *N. rhodocrans*. *M. balnei* est une espèce à la fois à développement rapide et, semble-t-il, photochromogène, mais sensible à la kanamycine et aux sulfones (F. Grumbach).

Les *Nocardia* pathogènes sont en général fortement réducteurs, 1 seule souche saprophyte est négative.

On voit que la réaction de Virtanen donne des résultats très nuancés. D'une part, les Mycobactéries réductrices : *M. tuberculosis hominis*, *M. kansasii*, dont se rapprochent les *Nocardia* pathogènes, d'autre part les Mycobactéries, non réductrices : *M. tuberculosis bovis* et *muris*, *M. balnei*, *johni ulcerans* et *chelonei*, et peut-être les *Nocardia* saprophytes. Entre ces deux groupes, le bacille aviaire, les paratuberculeux scotochromogènes et non photochromogènes.

La méthode de réduction des nitrates est d'une technique simple, facile à lire, ne nécessite que peu de germes. Elle vérifie et complète la méthode de recherche de l'acide nicotinique. Ces deux réactions doivent être utilisées simultanément, elles n'exigent en fait qu'un seul tube de Jensen pourvu que la culture soit assez riche et âgée d'un mois.

RÉSUMÉ.

La méthode d'identification des Mycobactéries par la réduction des nitrates selon Virtanen est d'une technique simple, facile à mettre en œuvre dans tous les laboratoires. Nos observations confirment les recherches de l'auteur.

131 souches de bacilles tuberculeux humains sont toutes fortement positives ainsi que 29 souches sur 30 de paratuberculeux photochromogènes (*M. kansasii*) et la plupart des Mycobactéries à croissance rapide et des *Nocardia* pathogènes. Sont négatives : 48 souches de bacilles tuberculeux bovins sur 50 et le BCG-Paris, 3 souches de bacilles de Wells, 2 *M. johni*, 1 *M. ulcerans*, 2 *M. balnei*, 1 *M. chelonei*, 1 *N. rhodocrans*.

Entre ces deux groupes, 13 souches de bacille tuberculeux aviaire sur 16 sont négatives, 30 bacilles paratuberculeux scotochromogènes sont négatifs, 8 positifs, 2 douteux. Sur 26 paratuberculeux non photochromogènes, 12 sont positifs, 11 négatifs, 3 douteux.

Ces résultats nuancés vérifient et complètent ceux qui sont fournis par le recherche de l'acide nicotinique (Konno) suivant une technique déjà décrite. Ces deux méthodes, ne nécessitant à elles deux qu'un seul tube de culture, doivent être constamment associées.

SUMMARY

IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA BY MEANS OF NITRATE REDUCTION.

The identification of Mycobacteria by means of nitrate reduction following Virtanen is easy to carry out in any laboratory. The author's experiments confirm Virtanen's findings.

The reaction yielded positive results with 131 strains of human tubercle bacilli, 29 strains (out of 30) of photochromogeneous paratubercle bacilli (*M. kansasii*), and most of rapidly growing Mycobacteria and pathogenic *Nocardia*.

Negative results were obtained with 48 (out of 50) bovine tubercle bacilli and the strain BCG-Paris, 5 strains of Wells' bacillus, 2 *M. johnei*, 1 *M. ulcerans*, 2 *M. balnei*, 1 *M. chelonae*, 1 *N. rhodocrans*.

Between these two groups, 13 strains of avian tubercle bacilli out of 16 are negative, 30 strains of scotochromogeneous paratubercle bacilli are negative, 8 are positive, 2 doubtful. Out of 26 non photochromogeneous paratubercle bacilli, 12 are positive, 11 negative, 3 doubtful.

These results confirm and complete those obtained by means of nicotinic acid detection (Konno) according to an already described technique. These two methods require only one culture tube and should always be associated.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOISVERT (H.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 600.
 - [2] VIRTANEN (S.). *Acta tub. scand.*, 1960, supplément 48.
 - [3] SHINN (M. B.). *Industr. Eng. Chem. anal.*, Ed., 1941, **13**, 33.
 - [4] BRATTON (A. C.) et MARSHALL (E. K.). *J. chem. Biol.*, 1937, **122**, 263.
 - [5] BOYER (F.). *Thèse de sciences*, Paris, 1951.
 - [6] TACQUET (A.) et TISON (F.). *Rev. Tub.*, 1960, **24**, 713.
-

TUMEURS SPONTANÉES SUR RACINES DE LÉGUMINEUSES STÉRILES

LEUR SIGNIFICATION POSSIBLE DANS LA SYMBIOSE A RHIZOBIUM

par Ch. BONNIER (*) (**) (***).

(Laboratoire de Microbiologie, Institut Agronomique de Gembloux,
Belgique)

INTRODUCTION.

Les essais et observations effectués jusqu'ici nous ont amené à la conclusion suivante en ce qui concerne la spécificité des *Rhizobium* vis-à-vis de leurs hôtes légumineuses : les diverses souches de *Rhizobium* forment un groupe de bactéries possédant des caractères communs et capables, à la suite d'un processus d'adaptation, de vivre en symbiose dans les nodosités des légumineuses en fixant éventuellement l'azote atmosphérique.

Ce phénomène d'adaptation (le mot étant pris dans son sens le plus large) correspond bien à la réalité ; il est démontré non seulement par des observations empiriques effectuées par des praticiens depuis longtemps, mais encore par des essais rigoureux de semis successifs notamment [1, 2], de greffes interspécifiques [3] et intergénériques [4].

Si l'on définit la nodosité radiculaire des légumineuses comme une excroissance où vivent des bactéries du type *Rhizobium*, et formée le plus souvent à partir d'un primordium de racine secondaire évoluant en nodosité plutôt qu'en racine (c'est la seule définition qui comprenne toutes les observations), on s'aperçoit très vite que, même pour une espèce légumineuse déterminée, l'aspect extérieur des nodosités, leur morphologie, peuvent varier dans de grandes proportions. On connaît, pour les *Medicago* par exemple, non seulement des nodules « ineffectifs », de dimensions très petites, et des nodules actifs de 2 à 3 mm de longueur

(*) Associé du Fonds National de la Recherche Scientifique.

(**) Recherches effectuées sous les auspices du Centre Interuniversitaire pour l'Etude de la Croissance normale et pathologique.

(***) Manuscrit reçu le 8 novembre 1960.

en moyenne, mais encore des formes nodulaires digitées, en véritables grappes, en amas qui peuvent atteindre plus de 20 mm de longueur et qui sont attachées à la racine par un seul « pédoncule ».

Au cours de multiples prospections effectuées en région équatoriale [5], nous avons eu l'occasion de rencontrer sur diverses espèces des formes caractéristiques, fort variables, d'un aspect tourmenté, distinctes des nodosités telles qu'elles sont le plus souvent reconnues. On en trouve en assez grand nombre sur les racines de *Desmodium adscendens*, de *Mimosa invisa*, de *Pueraria javanica*, de *Phaseolus angularis*, et surtout sur *Canavalia ensiformis*, bien souvent sur des racines portant également des nodosités normales. Ces excroissances sont souvent constituées par des gonflements de la racine, tout à fait typiques. Fait significatif, nous avons pu, dans nombre de cas, isoler de ces excroissances, après un sévère traitement de désinfection externe, des souches bactériennes macroscopiquement et microscopiquement indifférenciables des *Rhizobium*. Elles présentent notamment de nombreuses formes en Y, en X, et en T, si caractéristiques des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae*. Ces néoformations ne peuvent être des nodosités normales en cours de développement ; la distinction est en effet très aisée pour un observateur averti. Elles diffèrent essentiellement des nodosités jeunes dont il est aisé de suivre le développement ultérieur. Il ne peut s'agir non plus, ni de faux nodules semblables à ceux signalés par Allen [6] et par nous-mêmes sur *Arachis* [7] et dont aucun organisme ne peut être isolé, ni de galles à nématodes, très fréquentes sous les tropiques mais aisément identifiables.

A la suite de ces observations et des résultats obtenus lors d'essais d'adaptation [7], nous avons formulé l'hypothèse que ces nodosités anormales constituaient des formes intermédiaires [8], témoins d'un processus d'adaptation de souches quelconques de *Rhizobium* à une légumineuse donnée.

Ces formes intermédiaires de nodosités, telles que nous les concevions dans cette hypothèse, étaient dues, pensions-nous, à l'invasion d'une légumineuse-hôte par des souches de *Rhizobium* autochtones, non spécifiques, telles qu'elles résultaient d'activités symbiotiques diverses, antérieures au semis. Or, s'il est évident qu'un *Rhizobium* spécifique, adapté à une légumineuse déterminée, provoque sur les racines de celle-ci la formation de nodosités normales, les nouveaux essais que nous allons décrire apportent une donnée nouvelle : des excroissances radiculaires, d'aspect parfois identique aux nodosités à *Rhizobium* mais le plus souvent de forme plus irrégulière et de dimensions plus grandes, peuvent se former sur les racines de légumineuses cultivées aseptiquement, en l'absence de toute bactérie. De plus,

jusqu'à présent tout au moins, nous n'avons observé ces néoformations que sur racines de légumineuses, à l'exclusion des espèces non-légumineuses introduites dans les expériences.

MATÉRIEL ET MÉTHODE.

Dans le cadre des recherches effectuées sur la spécificité du *Rhizobium* et sur les relations de cette bactérie avec *Agrobacterium tumefaciens*, agent des tumeurs « crown-gall », nous avons réalisé plusieurs milliers de cultures aseptiques de plantules stériles. Des *Medicago sativa*, des *Trifolium pratense*, des *Vicia villosa*, des *Soja hispida*, des *Pisum sativum*, des *Phaseolus vulgaris*, des *Arachis hypogaea*, des *Pueraria javanica*, pour ne citer que les légumineuses, ont été élevés en tubes à essais, de dimensions variables suivant l'espèce considérée (dans tous les cas, une plantule par tube). La technique utilisée pour la désinfection des graines, la mise en germination et la vérification de leur stérilité a été décrite précédemment [9]. Le milieu minéral gélosé où se développaient les plantules a une composition identique à celle du milieu de Nicol et Thornton [10], mais contenait en plus 200 mg par litre de KNO_3 . Dans les conditions où nous travaillons, cette faible dose semble en effet, d'après Brakel [11], favoriser la nodulation des légumineuses à petites graines.

En variantes, le même milieu minéral, non gélosé, a été utilisé. Dans ce dernier cas, la plantule était installée sur un support constitué par un papier-filtre enroulé, dont la partie supérieure émergeait du substrat liquide. Dans d'autres cas enfin, le milieu minéral était remplacé par un mélange, en parties égales, de terre assez riche en matière organique et de vermiculite. Dans tous les essais, le milieu était stérilisé à l'autoclave ; trois passages d'une heure à 120° C, effectués à intervalles de vingt-quatre heures, étaient nécessaires pour stériliser les tubes contenant la terre. Les légumineuses à grosses graines étaient, dès le début de la germination, privées de la plus grande partie possible de leurs cotylédons. Avec Brouwers [12], nous avons démontré que cette mutilation était indispensable, lors de cultures en tubes de verre, pour élever le rapport C/N dans la plante et permettre ainsi la nodulation.

Des groupes des diverses légumineuses utilisées ont été ainsi cultivés, soit comme témoins non inoculés, soit après inoculation au moyen de 1/2 cm³ d'une suspension aqueuse de diverses souches de *Rhizobium* non spécifiques de notre collection ou de la souche t.6 d'*Agrobacterium tumefaciens* du laboratoire.

Le nombre de répétitions dans chacun des tests variait de 100 à 200. Plus de 10 000 plantules légumineuses ont pu ainsi être examinées.

Par la suite, et en raison des résultats obtenus, nous avons introduit dans les expériences, dans les mêmes conditions de culture et avec autant de répétitions, des espèces non légumineuses dont : *Linum usitatissimum*, *Cannabis sativa*, *Beta vulgaris*, *Panicum miliaceum*, *Sinapis alba*, *Brassica napus* var. *oleifera*, toutes choisies en fonction des possibilités de désinfection de leurs semences.

RÉSULTATS.

Nous avons observé sur *Trifolium pratense*, sur *Vicia villosa*, et surtout sur *Medicago sativa* des excroissances radiculaires de formes variables, même dans les tubes où ces plantules étaient maintenues non inoculées, en conditions parfaitement stériles.

Ces excroissances ne se forment jamais, dans les conditions où nous travaillons, avant 30 jours au moins. Après deux et trois mois de culture, de nouvelles excroissances radiculaires apparaissent sur des plantes indemnes jusque-là.

Le pourcentage total de plantes portant des tumeurs est variable : d'environ 5 p. 100 en général, il peut atteindre 10 p. 100 pour certaines espèces et selon les conditions du milieu. *Medicago sativa* qui, dans nos essais, constitue l'espèce réagissant le plus nettement, forme des proliférations radiculaires que l'on pourrait classer en trois types :

1° Des amas digités, assez semblables au point de vue morphologie aux nodules à *Rhizobium* en grappes, bien connus, tels qu'on peut les observer dans la nature. Ces amas, plus ou moins circulaires et constitués de « doigts » assez rapprochés, peuvent atteindre dans certains cas un diamètre de 10 mm.

On peut en obtenir un ou plusieurs par système racinaire observé. La couleur de ces formations est jaunâtre et leur surface est lisse.

2° Des excroissances en collier, d'un blanc neigeux, le plus souvent situées sur la racine principale, en nombre relativement élevé. Il est rare d'observer un système racinaire ne portant qu'une seule de ces formations. Les dimensions de celles-ci dépassent rarement 3 mm. Elles apparaissent donc nettement différentes des premières.

3° Des « nodules » assez petits, extérieurement indifférenciables des nodosités typiques à *Rhizobium* et répartis en un, deux ou trois exemplaires sur les racines secondaires, ce qui, à nouveau, les rapproche très nettement des formations symbiotiques habituelles.

Sur milieu minéral gélosé on peut rencontrer les trois types d'excroissances. En milieu liquide, les racines immergées ne

portent que des formations du second type, en colliers blanc neigeux, tandis que les grappes ne s'observent que sur la partie radiculaire située au-dessus du niveau du milieu liquide. Enfin,

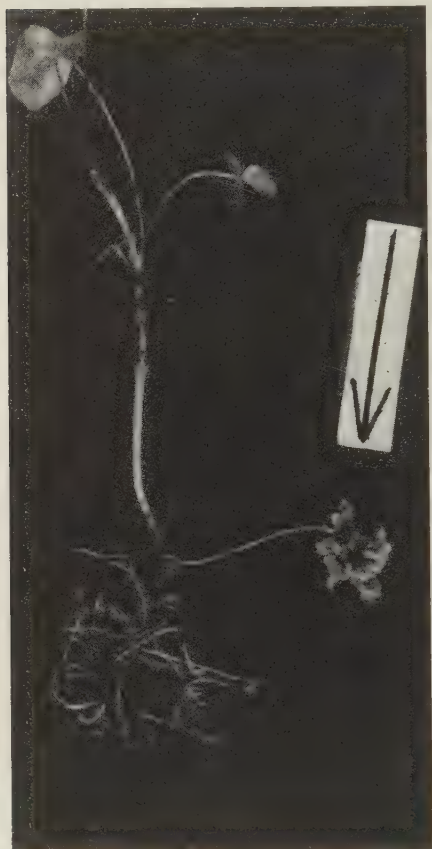


FIG. 1.

FIG. 1. — Plantule de *Medicago*, extraite de son tube de culture, portant sur une racine une tumeur spontanée, en amas digité, du type décrit au paragraphe 1^o ci-dessus.



FIG. 2.

FIG. 2. — Tumeurs spontanées, en colliers d'un blanc neigeux, sur la racine principale d'une plantule de *Medicago*.

en tubes contenant de la terre comme substrat, on trouve des formes en grappes ou semblables aux nodules vrais, et rarement des formes en collier.

La description qui précède vaut surtout pour les *Medicago*. Sur *Trifolium* et *Vicia*, nous n'avons observé que des formes extérieurement semblables aux nodules à *Rhizobium* caractéristiques de ces espèces, avec un taux de réactions plus faible et après un temps plus long que dans le cas de *Medicago*.

Trois observations parallèles méritent d'être signalées :

A) En dehors de ces nombreuses plantules cultivées aseptiquement et non inoculées, nous avons, exactement de la même façon et sur les trois substrats, cultivé les mêmes espèces en les inoculant de la manière habituelle avec des souches de *Rhizobium* non spécifiques ainsi qu'avec une souche d'*Agrobacterium tumefaciens*. L'obtention de néoformations radiculaires, après le même temps est exactement semblable à ce qui a été observé en conditions stériles. De plus, le pourcentage de réactions n'est pas supérieur. Mais un fait, à notre avis remarquable, est ici à signaler.

Dans de nombreux cas, les *Rhizobium* ou les *Agrobacterium tumefaciens* inoculés se retrouvent, après un sévère traitement de désinfection externe, à l'intérieur des excroissances radiculaires obtenues. De même, si l'inoculation s'effectue avec une souche de *Rhizobium*, spécifique ou non, ou avec la souche d'*Agrobacterium tumefaciens*, après l'obtention d'excroissances stériles, la bactérie se retrouve également, au bout d'un certain temps, à l'intérieur de celles-ci. Dans le cas d'une inoculation avec *Rhizobium* spécifique, de nouveaux nodules, normaux ceux-ci, se forment en supplément.

Si, dès le début de l'expérience, des plantules sont inoculées, non plus avec une souche non spécifique mais avec une suspension contenant en mélange une dizaine de ces souches non spécifiques, le pourcentage de réactions s'élève très nettement, pour atteindre, après soixante jours, 40 p. 100 par exemple. Notons que la quantité totale de bactéries inoculées est cependant sensiblement la même dans les deux cas. Nous détaillerons ultérieurement ce phénomène.

B) Des plantules de *Medicago sativa*, cultivées sur le même milieu liquide et inoculées avec une souche spécifique de *Rhizobium*, souche 1,5 de référence, ont formé des nodosités « effectives » (le développement de la plantule en témoigne), bourrées de *Rhizobium*, nodosités absolument indifférenciables, au point de vue morphologie, des formations blanc neigeux en collier du type 2, telles qu'elles peuvent être obtenues en conditions stériles.

C) Au cours d'essais sur l'écologie des *Rhizobium*, nous avons cultivé des *Medicago sativa* en tubes à essais, garnis de sols de diverses origines, prélevés aseptiquement et non stérilisés.

Sur les sols dépourvus de *Rhizobium* spécifique de *Medicago*, nous avons obtenu, dans certains cas et après trente jours au moins, des formations radiculaires anormales, semblables aux formes décrites plus haut, à partir desquelles nous avons pu, chaque fois, isoler des souches bactériennes indifférenciables des *Rhizobium*. Ces diverses souches, inoculées en conditions aseptiques cette fois, provoquent la formation, assez régulière, de nodosités « ineffectives » sur la légumineuse considérée.

En raison de l'intérêt de ces observations sur l'aptitude des légumineuses à former des excroissances radiculaires en conditions stériles, nous avons voulu connaître le comportement d'espèces non légumineuses.

Exactement dans les mêmes conditions, et avec un aussi grand nombre de répétitions, nous avons cultivé des *Linum*, des *Cannabis*, des *Beta*, des *Panicum*, des *Sinapis*, des *Brassica*. Dans aucun cas, même après plusieurs mois de culture, nous n'avons obtenu de réactions similaires.

Dans l'état actuel de nos essais, nous constatons que seules des légumineuses manifestent cette propriété. Les seules réactions obtenues avec des non légumineuses ont été observées en conditions non stériles, après inoculation au moyen de la souche d'*Agrobacterium tumefaciens*, qui provoque parfois, sans blessure préalable, une tumeur « crown-gall » sur racines [13].

DISCUSSION.

Les essais que nous venons de rapporter méritent sans aucun doute quelques commentaires. Il apparaît que des légumineuses, et elles seules semble-t-il, peuvent, en bonnes conditions de température et d'humidité, former sur leurs racines des excroissances de formes variables, en milieu parfaitement aseptique, en l'absence de toute bactérie. Des formations analogues s'observent dans la nature ; nous en avons analysé certaines en milieu équatorial [5] ainsi que sur des sols locaux dépourvus de *Rhizobium* spécifique.

Dans une revue assez récente [14], P. Manil pose la question suivante : « Comment pouvons-nous expliquer la compatibilité entre des microorganismes particuliers et une famille botanique ? » En d'autres termes, pourquoi les légumineuses, et elles seules, sont-elles colonisées par le *Rhizobium* ? On peut répondre que les légumineuses auraient une prédisposition toute particulière à former des tumeurs au point d'émergence des racines secondaires. Elles pourraient par là donner à la bactérie l'occasion de s'installer sur leur système racinaire. Les bactéries trouveraient, à l'origine, dans ces excroissances un milieu particulièrement propice à leur développement et à leur évolution.

Il est remarquable en effet, que les formations que nous avons observées peuvent être colonisées par le *Rhizobium* ou l'*Agrobacterium tumefaciens* ; en effet, dans le cas des excroissances stériles obtenues artificiellement, une inoculation postérieure permet de retrouver les bactéries à l'intérieur tandis que, dans la nature, les formations recueillies sont toujours colonisées par des bactéries macroscopiquement et microscopiquement semblables au *Rhizobium* et à l'*Agrobacterium tumefaciens*. A la suite des observations effectuées dans la nature, nous pensons [5] que ces excroissances étaient provoquées par des souches de *Rhizobium* non spécifiques. Nous pouvons affirmer actuellement que ces néoformations peuvent naître indépendamment du *Rhizobium*, mais que la bactérie s'y installe, qu'elle soit spécifique ou non.

Nous pensons avoir observé ainsi la première manifestation du phénomène, difficile à contester, de l'adaptation des souches non spécifiques de *Rhizobium* à une légumineuse donnée. S'il est certain qu'une souche de *Rhizobium* garde le « souvenir » de son hôte précédent, on est en droit de se demander comment. De nombreux essais de transmission de certaines propriétés d'une souche bactérienne à une autre ont été effectués avec succès grâce à l'utilisation d'acide désoxyribonucléique extrait des cellules de l'une de ces bactéries ; notamment pour rendre tumorigène une souche de *Rhizobium* cultivée en présence d'ADN d'*Agrobacterium tumefaciens* (Klein et Klein [15]) ou pour rendre spécifique une souche de *Rhizobium* non spécifique, cultivée en présence d'ADN de *Rhizobium* spécifique (Balassa [16, 17]).

Dans le cas qui nous occupe, ne peut-on penser que des échanges comparables sont possibles, directement de la plante-hôte à la bactérie ? Des cellules en multiplication de l'hôte peuvent en effet entrer en contact intime avec la bactérie non spécifique. On peut concevoir que des échanges s'effectuent à ce niveau, d'où peuvent résulter, à la suite de processus encore inconnus, la capacité pour la bactérie de provoquer la symbiose fixatrice d'azote, telle que nous la connaissons. Nous pouvons citer ici Bawden [18] : « Les fungi et les bactéries pathogènes entrent en contact tellement intime avec leurs hôtes qu'il doit exister beaucoup de possibilités d'échanges de composés cellulaires à partir desquels des maladies à virus pourraient se développer ». Il est par ailleurs remarquable que Bawden choisit précisément comme exemple *Agrobacterium tumefaciens*.

Aussi notre nouvelle hypothèse de travail, point de départ des essais futurs, pourrait se résumer actuellement comme suit : une souche quelconque de *Rhizobium*, non spécifique d'une légumineuse donnée, s'adapterait à celle-ci par l'intermédiaire des excroissances spontanées qui peuvent se former sur les racines

des légumineuses ; la multiplication de la bactérie, au contact intime de composants cellulaires de l'hôte, provoquerait un changement dans ses propriétés symbiotiques et la rendrait capable d'établir une symbiose active sur la légumineuse considérée. Un *Rhizobium* « non spécifique » par contact *in situ* avec des constituants cellulaires frais de l'hôte pourrait donner naissance à une souche de *Rhizobium* possédant dans ses constituants cellulaires un ou des éléments captés à une cellule de l'hôte, élément qui serait reproduit au cours de la multiplication ultérieure de la bactérie, soit en milieu artificiel au laboratoire, soit dans la nodosité qui se constitue à partir des cellules végétales blessées.

Insistons sur le fait que, au stade actuel, il ne s'agit que d'une hypothèse de travail. L'étude anatomique des excroissances sera réalisée. Des réisolements à partir d'excroissances, déjà effectués, seront multipliés et les souches obtenues seront inoculées et réisolées en une série de passages successifs ; leur évolution sera ainsi soigneusement observée.

RÉSUMÉ.

L'auteur a observé que des légumineuses, et elles seules dans le cadre des essais effectués jusqu'ici, peuvent former des excroissances radiculaires spontanées, en conditions parfaitement stériles. Une inoculation postérieure d'un *Rhizobium* quelconque ou d'un *Agrobacterium tumefaciens* permet de retrouver la bactérie à l'intérieur de ces excroissances. Ce phénomène constituerait, selon l'auteur, la première manifestation du processus d'adaptation de souches quelconques de *Rhizobium* à une légumineuse donnée.

L'auteur envisage que des échanges de constituants cellulaires entre bactérie et plante-hôte, à la suite d'un contact intime, puissent transformer une bactérie non spécifique.

L'adaptation des *Rhizobium* à leurs hôtes légumineuses apparaît en effet comme un phénomène difficile à contester.

SUMMARY

SPONTANEOUS TUMORS ON THE ROOTS OF GERM-FREE *Leguminosae*.
THEIR POSSIBLE SIGNIFICANCE
IN THE *Rhizobium*-*Leguminosae* SYMBIOSIS.

The experiments show that roots of *Leguminosae* may form spontaneous outgrowths in germ-free conditions. This phenomenon was observed only in the *Leguminosae* family. Any species of *Rhizobium* or of *Agrobacterium tumefaciens* inoculated into the tubes *a posteriori* multiplies within the tumors. The author inter-

prets this phenomenon as being the first symptom of the adaptation process of a non specific strain to a given *Leguminosa*.

The author suggests that an exchange of cellular constituents following a narrow contact between bacterium and host plant might transform a non specific bacterium.

The adaptation of *Rhizobium* species to their hosts seems to be an unquestionable phenomenon.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BONNIER (Ch.). *Bull. Inst. Agr. Stat. Rech. Gembloux*, 1950, **18**, 218-219.
 - [2] BONNIER (Ch.). *Bull. Inst. Agr. Stat. Rech. Gembloux*, 1951, **19**, 229-230.
 - [3] HELY (F. W.), BONNIER (Ch.) et MANIL (P.). *Nature*, 1953, **171**, 554.
 - [4] BONNIER (Ch.), HELY (F. W.) et MANIL (P.). *Atti VI^o Congr. intern. Microbiol.*, Roma, 1953, vol. VI, sez. XVIII, 328.
 - [5] BONNIER (Ch.). *Publ. Inst. nation. Etude agron. Congo belge. Série scient.*, 1957, n° 72.
 - [6] ALLEN (O. N.) et ALLEN (Ethel). *Proc. Hawaiian Acad. Sci., spec. publ.*, 1940, **35**, 15-16.
 - [7] BONNIER (Ch.). *Antonie van Leeuwenhoek*, 1958, **24**, 1.
 - [8] BONNIER (Ch.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 537-556.
 - [9] MANIL (P.) et BONNIER (Ch.). *Bull. Inst. Agr. Stat. Rech. Gembloux*, 1949, **17**, 123-146.
 - [10] NICOL (H.) et THORNTON (H. G.). *Proc. of the Royal Soc., Série B*, 1941, **130**, 858.
 - [11] BRAKEL (J.). [Communication personnelle].
 - [12] BONNIER (Ch.) et BROUWERS (L.). *Bull. Inst. Agr. Stat. Rech. Gembloux*, 1958, **26**, 2-4.
 - [13] BONNIER (Ch.). *Bull. Inst. Agr. Stat. Rech. Gembloux*, 1960 (sous presse).
 - [14] MANIL (P.). *Proc. Univ. Nottingham. Fifth Easter School in Agr. Sci.*, 1958, 124-136.
 - [15] KLEIN (Deana) et KLEIN (R. M.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 220.
 - [16] BALASSA (R.). *Acta Microb. Acad. Sci. Hung.*, 1954, **2**, 51.
 - [17] BALASSA (R.). *Acta Microb. Acad. Sci. Hung.*, 1957, **4**, 85.
 - [18] BAWDEN (F. C.). *Plant viruses and virus diseases*, 3^e édit., 1950. Waltham, Mass. U. S. A.
-

ÉTUDE DU POUVOIR BACTÉRIOSTATIQUE ET BACTÉRICIDE DE QUELQUES COMPOSÉS VIS-A-VIS D'UNE SOUCHE PURE DE BACTÉRIES SULFATO-RÉDUCTRICES

par E. LAGARDE (*)

(C. N. R. S., *Centre de Recherches Scientifiques Industrielles
et Maritimes, Marseille*)

Parmi les êtres vivants qui, par leurs activités biologiques, peuvent avoir sur l'économie une incidence importante, les bactéries réductrices des sulfates occupent une place de premier plan.

Découverts par Beijerinck en 1895 [1], ces microorganismes jouent en effet un rôle déterminant dans les processus de corrosion anaérobie du fer et des métaux ferreux, type de corrosion analysé par von Wolzogen-Kuhr et Van der Vlugt [2]. Ce rôle, longtemps méconnu, est maintenant admis par tous, et l'industrie du pétrole, ainsi que l'ont signalé Davis et Updegraff [3], puis Beerstecher [4], a particulièrement à redouter les dommages provoqués par ces germes. En effet, une revue statistique de Wessel [5] révèle qu'aux Etats-Unis les dégâts provoqués par la corrosion s'élèvent chaque année à 5 à 6 milliards de dollars.

De nombreux auteurs ont montré la présence de bactéries sulfato-réductrices dans les sols, les eaux douces et salées, les sédiments marins et, de ce fait, rares sont les installations qui échappent à leurs dommages. Les produits destinés à inhiber leur prolifération ont donc fait et font encore l'objet de maintes études ; Chevalet [6] avait utilisé des phénols, Drummond et Postgate [7] des chromates, mais ces produits présentent des inconvénients qui limitent leur utilisation. Plus efficaces sont la formaldéhyde, utilisée par Kusnezova et coll. [8], et certains ammoniums quaternaires étudiés par Allred [9].

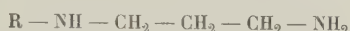
En contribution à ces travaux, nous avons récemment déterminé les pouvoirs bactériostatique et bactéricide de divers composés

(*) Manuscrit reçu le 25 novembre 1960.

plus spécialement destinés à la lutte contre la corrosion biologique des installations pétrolières (1).

PRODUITS ÉPROUVÉS.

1° *Alkyl-amino-propylène-amine* (produit actif : 70 p. 100) :

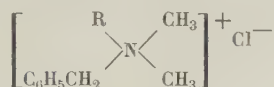


R étant une chaîne aliphatique avec 14 à 18 atomes de C. Ce produit comporte en outre un émulsifiant cationique oxyéthylé.

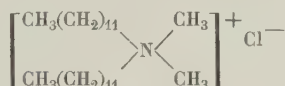
2° *Acétate d'amines primaires du coprah* (produit actif : 100 p. 100) :



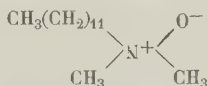
3° *Chlorure de diméthyl-benzyl-lauryl-ammonium*, en solution à 85 p. 100 dans l'isopropanol (produit actif : 85 p. 100) :



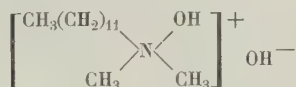
4° *Chlorure de diméthyl-di-coprah-ammonium*, en solution à 75 p. 100 dans l'isopropanol (produit actif : 75 p. 100) :



5° *Oxyde de lauryl-diméthyl-amine* (produit actif : 50 p. 100) :



ou, sous sa forme hydratée :



6° *Amino-sel, du type alkyl-amino-propionate de soude*, la chaîne alkyl dérivant des acides gras du coprah (produit actif : 75 p. 100).

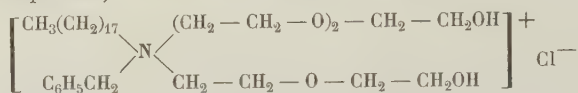


7° *Amino-sel, du type alkyl-amino-acétate de soude*, la chaîne alkyl dérivant des acides gras du coprah (produit actif : 100 p. 100) :



(1) Nous remercions vivement la Société « Prochinor », qui a bien voulu nous confier ces essais.

8° Chlorure de stéaryl-dipolyglycol-benzyl-ammonium (produit actif : 100 p. 100) :



9° Mélange à 50/50 des composés 3 et 4.

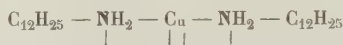
10° Mélange à 50/50 des composés 3 et 2.

11° Mélange à 50/50 des composés 3 et 6.

12° Complexe d'alkyl-amino-propionate de cuivre (produit actif : 37,5 p. 100 : cuivre, 3,4 p. 100) :



13° Complexe de lauryl-amine-acétate de cuivre (produit actif : 100 p. 100 ; cuivre : 7 p. 100) :



14° Formaldéhyde en solution aqueuse à 40 p. 100.

A partir de ces composés, on a réalisé une solution de base (ou une dispersion selon les produits) à 1 000 ppm, cette solution a été ensuite diluée de façon convenable pour les essais.

SOUCHE ET MILIEU DE CULTURE.

Nous avons utilisé pour ces essais une souche pure de *Sporovibrio* (ou *Desulfovibrio*) *desulfuricans*, isolée en 1958 d'un forage pétrolier (les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques de cette souche bactérienne feront l'objet d'une communication ultérieure). Cette souche a été isolée sur milieu de Starkey [10], puis régulièrement entretenue sur une variante du milieu préconisé par Allred [11], de composition suivante : K_2HPO_4 : 0,002 g ; lactate de soude à 60 p. 100 : 3 g ; Yeast extract Difco : 0,20 g ; acide ascorbique : 0,20 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 0,40 g ; NaCl : 2 g ; sel de Mohr : 0,02 g ; eau distillée : 200 ml. le pH final est amené à 7,2 par quelques gouttes de NaOH, N/10. Le milieu est stérilisé trente minutes à 112° C. La solution de sel de Mohr, stérilisée à part par filtration, est ajoutée après refroidissement.

Nous avons utilisé ce milieu pour les essais de pouvoir bactériostatique. Pour la détermination du pouvoir bactéricide, le milieu a été solidifié par adjonction de 14 g p. 1 000 d'agar.

TECHNIQUES.

a) *Pouvoir bactériostatique.* — Les méthodes utilisées pour la mise en évidence du pouvoir bactériostatique consistent à mettre en présence une quantité fixe de culture bactérienne pure et des dilutions variables des produits à éprouver : [11, 12, 13]. On observe ainsi les seuils d'inhibition, autrement dit la concentration minima suffisante du produit arrêtant la prolifération, ou tout au moins la division bactérienne.

Nous avons, lors de cette étude, employé la méthode préconisée par Allred [11]. L'inoculum (10 ml de culture pour 1 litre de milieu), est obtenu à partir d'une culture de vingt-quatre heures de la souche citée plus haut. Les divers produits sont répartis dans des flacons stériles de 60 ml, avec bouchon à vis, de façon à réaliser des concentrations finales en antiseptique de 5 à 100 ppm. Les flacons sont alors remplis complètement avec le milieuensemencé et incubés à 37°. Les travaux ont été exécutés en double avec 3 flacons par concentration et par produit. Les examens quotidiens ont été poursuivis pendant trente jours après noircissement des témoins, ces derniers étant constitués par des flacons contenant seulement le milieuensemencé, en l'absence d'antiseptique.

b) *Pouvoir bactéricide.* — Le principe de l'étude du pouvoir bactéricide est très différent. Il consiste en effet, à mettre en présence un nombre connu de cellules bactériennes et une quantité fixe du produit à étudier (ici 5 ppm), pendant des temps variables (soit quinze minutes, trente minutes, une heure), puis des aliquotes sont prélevées et mises en culture. On compte alors le nombre de cellules survivantes, par rapport à des témoins, chaque colonie étant supposée naître d'une cellule unique.

Le milieu, réparti en tubes de 8 x 200 mm, est stérilisé, puis placé dès la sortie de l'autoclave dans un bain-marie thermostatique à 44°, afin de maintenir la gélose en surfusion. On ajoute alors stérilement à chaque tube, 2 gouttes de la solution de sel de Mohr. Nous avons préalablement réalisé une dilution convenable de culture de vingt-quatre heures de la souche citée, susceptible de fournir 60 colonies en moyenne par tube de milieu gélosé. Des inoculums de cette dilution sont mis en présence d'une solution à 5 ppm des divers produits, puisensemencés après quinze minutes, trente minutes, une heure de contact, l'inoculum étant réparti dans le milieu par 3 retournements successifs des tubes. Ces derniers sont finalement refroidis brusquement par immersion dans de l'eau. On répartit alors dans chaque tube une épaisse couche de gélose stérile, pour maintenir les conditions d'anaérobiose et éviter le dessiccation du milieu.

Au bout de soixante-douze heures en moyenne d'incubation à 32°, apparaissent au sein des tubes des colonies de *Sporovibrio desulfuricans* qu'il est aisé de compter. Le nombre de colonies par rapport aux témoins, permet de calculer le pourcentage de cellules survivantes. Les expériences ont été faites en double, avec, pour chaque produit, 4 tubesensemencés après chaque temps de contact et 4 témoins.

RÉSULTATS.

a) *Pouvoir bactériostatique.* — Les résultats de l'étude du pouvoir bactériostatique des produits éprouvés sont résumés dans la figure 1.

Le produit 2 est doué d'une activité remarquable, puisqu'il inhibe la prolifération microbienne à la concentration très faible

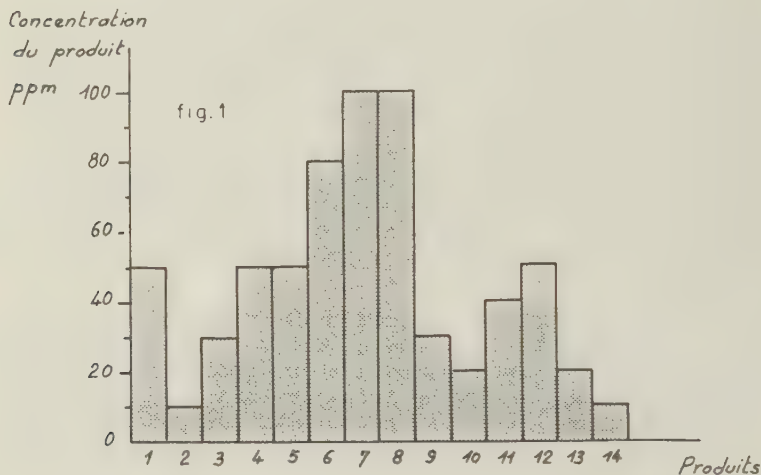


FIG. 1. — Pouvoir bactériostatique.

de 10 ppm, concentration inhibitrice du formol vis-à-vis de la souche considérée. Les produits 10, 13, 3, 9 sont également de bons inhibiteurs, ils agissent en effet aux concentrations de 20 ppm pour 10 et 13 et 30 ppm pour 3 et 9. Susceptibles de rendre encore des services, bien que doués d'un pouvoir bactériostatique moyen, sont le produit 11, actif à 40 ppm, et les composés 1, 4, 5, 12, dont la concentration inhibitrice minima est de 50 ppm. Les trois derniers composés, actifs seulement à des doses notablement plus élevées : 80 ppm pour 6 et 100 ppm pour 7 et 8, doivent être considérés comme étant doués d'une activité trop faible pour être industriellement valable en matière de lutte contre la corrosion biologique.

b) *Pouvoir bactéricide.* — Dans le tableau I se trouvent résumés les résultats de l'étude du pouvoir bactéricide des composés éprouvés.

Sept produits (1, 2, 3, 4, 8, 9, 13) peuvent être considérés comme bactéricides très actifs, puisque après quinze minutes de contact seulement, il ne subsiste aucune bactérie viable. Les produits 5 et 10 sont également valables, mais leur action est plus

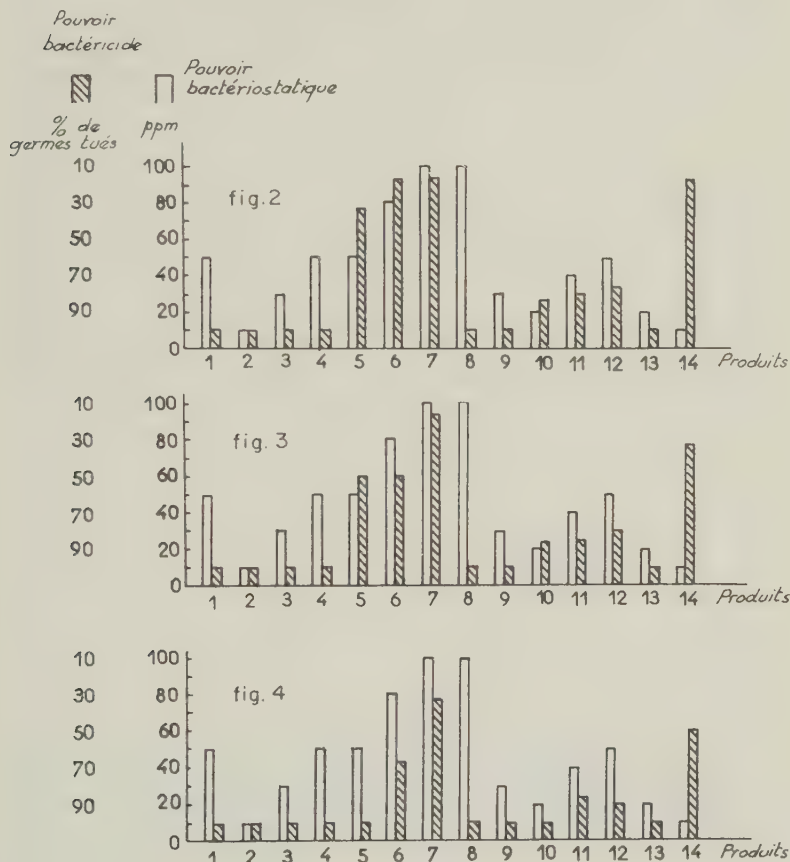


FIG. 2. — Pouvoir bactéricide (quinze minutes de contact).

FIG. 3. — Pouvoir bactéricide (trente minutes de contact).

FIG. 4. — Pouvoir bactéricide (une heure de contact).

lente, il faut en effet un contact d'une heure pour amener la destruction de toutes les cellules bactériennes. Les composés 11 et 12 montrent encore une activité, néanmoins leur pouvoir bactéricide doit être considéré comme insuffisant, car à la concentra-

tion de 5 ppm et après une heure de contact, quelques cellules restent viables. Les composés 6, 7 et 14 doivent, à la concentration de 5 ppm, être rejetés en tant que bactéricides (fig. 2, 3, 4).

TABLEAU I. — Pouvoir bactéricide.

PRODUITS	15 MINUTES DE CONTACT			30 MINUTES DE CONTACT			1 HEURE DE CONTACT		
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
1	0	60	100	0	60	100	0	60	100
2	0	60	100	0	60	100	0	60	100
3	0	60	100	0	60	100	0	60	100
4	0	60	100	0	60	100	0	60	100
5	40	20	33	30	30	50	0	60	100
6	50	10	17	30	30	50	20	40	67
7	50	10	17	50	10	17	40	20	33
8	0	60	100	0	60	100	0	60	100
9	0	60	100	0	60	100	0	60	100
10	10	50	83	8	52	87	0	60	100
11	12	48	80	8	52	87	8	52	87
12	14	46	77	12	48	80	6	54	90
13	0	60	100	0	60	100	0	60	100
14	50	10	17	40	20	33	30	30	50

(1) Nombre de bactéries survivantes ; (2) Nombre de bactéries tuées ;
(3) Pourcentage de bactéries tuées.

CONCLUSIONS.

On peut noter un certain parallélisme entre les pouvoirs bactériostatique et bactéricide des composés étudiés, à deux exceptions près cependant, ainsi que le montrent les figures 2, 3 et 4. On remarquera en effet que le produit 8, sans action bactériostatique valable, se trouve être doué, vis-à-vis de la souche considérée, d'un pouvoir bactéricide particulièrement intéressant. Inversement, la formaldéhyde, considérée à juste titre comme bactériostatique vrai [14], a montré un très faible pouvoir bactéricide.

Ainsi que des expériences préliminaires limitées viennent de le démontrer, les concentrations inhibitrices d'antiseptique varient suivant la température d'incubation des cultures et suivant les souches de *Sporovibrio desulfuricans*. Ces données seront développées dans une communication ultérieure ; mais on peut tirer de ces essais une conclusion d'ordre pratique, à savoir : la néces-

sité d'opérer, lors des travaux de recherche appliquée, sur des souches isolées à partir de l'installation à protéger, comme l'ont préconisé certains auteurs [1, 12].

Ces résultats semblent d'autre part confirmer ceux présentés par d'autres auteurs [15, 16], qui mettent en évidence l'action bactéricide de substances comportant dans leur formule le radical lauryle. Ce radical existe en effet chez les composés 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 13, qui se sont révélés être des bactéricides particulièrement efficaces.

RÉSUMÉ

L'étude des pouvoirs bactériostatique et bactéricide de 14 composés vis-à-vis d'une souche pure de *Sporovibrio desulfuricans* a été réalisée. Un certain parallélisme entre les actions bactériostatique et bactéricide a été noté, sauf chez deux composés, dont le formol. Quelques substances présentent un grand intérêt dans la lutte contre la corrosion biologique, car elles inhibent le développement bactérien à des concentrations très faibles (5 à 20 ppm) Parmi ces composés, ceux comportant le radical lauryle se sont montrés les plus actifs.

SUMMARY

STUDIES ON THE BACTERIOSTATIC AND BACTERICIDAL ACTIVITIES OF CERTAIN COMPOUNDS AGAINST A PURE STRAIN OF *Desulfovibrio desulfuricans*.

Bacteriostatic and bactericidal activities of 14 chemical compounds against a pure strain of *Desulfovibrio desulfuricans* have been studied. A certain parallelism was noticed between bacteriostatic and bactericidal actions, except for 2 compounds, one of them being formaldehyd. Some of these substances are of importance in the control of biological corrosion, because they inhibit bacterial development at low concentrations (from 5 to 20 p. p. m.). Among these compounds, those containing the lauryle radical were the most active.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] BEIJERINCK (M. W.). *Central Bakt. II Abt*, 1895, **1**, 1-49 et 104.
- [2] WOLZOGEN-KUHR (C. A. H. Von) et VLUGT (L. S. Van der). *Water*, 1934, **16**, 147.
- [3] DAVIS (J. B.) et UPDEGRAFF (D. M.). *Bact. Rev.*, 1954, **18**, 215.
- [4] BEERSTECHEER (E. Jr.). *Petroleum Microbiology*, Elsener Press Ed. New-York, 1954, 375.
- [5] WESSEL (C. J.). *News Rept. nat. Acad. Sc. U. S. A., N. R. C.*, 1957, **7**, 53.

- [6] CHEVALET (L.). *Gas world*, 1911, **54**, 655, et C. R. 38^e Congrès A. T. G., 1911, 304.
 - [7] DRUMMOND (J. P.) et POSTGATE (J. R.). *J. appl. Bact.*, 1955, **18**, 307.
 - [8] KUSNEZOVA (V. A.), ASHIROV (K. B.), GROMOVITCH (V. A.) et coll. *Mikrobiologuija*, 1957, **26**, 330.
 - [9] ALLRED (R.). *Sulphate reducing bacteria*, *Science Symposium*, St-Bonaventure Univ. U. S. A., 1957, 52.
 - [10] STARKEY (R. L.). *J. AWWA.*, 1948, **40**, 1, 291 et 298.
 - [11] ALLRED (R. C.). *Prod. Month.*, 1958, **22**, 9, 32-4.
 - [12] ALLRED (R. C.), MILLS (T. A.), FISHER (H. B.). *Prod. Month.*, 1954, **49**, 31.
 - [13] ANDERSON (K. E.), LIEGEY (F.). *Prod. Month.*, 1956, **20**, 31.
 - [14] BERRY (H.), PARKINSON (J. C.), *J. Pharm. Pharmacol.*, 1955, **7**, 16.
 - [15] BONE (J. N.), O' DAY (W.). *J. amer. Pharm. Ass. Sci.*, 1958, **47**, 795.
 - [16] BOLLE (A.) et KELLENBERGER (F.). *Pharm. Acta Helvet.*, 1958, **33**, 379.
-

LES PRODUITS DE DÉGRADATION DU FIBRINOGENÈ HUMAIN PAR LA PLASMINE

I. — SÉPARATION ET PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES (*)

par V. NUSSENZWEIG (**), M. SELIGMANN (***), J. PELMONT (****)
et P. GRABAR.

(avec la collaboration technique de M. BOUCART)

(*Service de Chimie Microbienne, Institut Pasteur*)

Les propriétés des produits de dégradation du fibrinogène par la plasmine ont été peu étudiées jusqu'à présent et la plupart des travaux sur ce sujet ont été effectués avec le fibrinogène bovin.

Au cours d'une étude immunologique de la fibrinogénolyse [1, 2], nous avons été amenés à fractionner les produits obtenus après une dégradation prolongée. La séparation de ces produits et l'étude de certaines de leurs propriétés physico-chimiques font l'objet de ce mémoire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

FIBRINOGENÈ. — Nous avons employé la méthode de Ware et coll. [3], décrite pour la préparation du fibrinogène bovin ; le plasma humain a été prélevé sur solution ACD ou sequestrène disodique. Le fibrinogène obtenu a été mis en solution de NaCl 0,15 M à des concentrations de 0,5 à 1,5 p. 100 puis maintenu à -20°C en ampoules scellées.

Le rendement de la méthode est relativement faible puisque nous avons récupéré 30 p. 100 environ du fibrinogène plasmatique. La coagulabilité par la thrombine du fibrinogène obtenu, déterminée par la méthode de Blombäck [4], a varié entre 75 et 100 p. 100 selon les préparations. Nous n'avons utilisé dans ce travail que celles des prépa-

(*) Manuscrit reçu le 29 novembre 1960.

(**) Boursier du Conseil National de Recherches du Brésil (adresse actuelle : Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Dept. Parasitologie, Brésil).

(***) Chargé de recherches au C. N. R. S.

(****) Service des Virus et Centre de Recherches de Médecine aéronautique.

rations dont la coagulabilité était supérieure à 90 p. 100. La coagulabilité de ce fibrinogène n'est pas modifiée après quinze à trente jours de conservation à -20° . Cette préparation ne contient pas de plasmine car elle peut rester à 20° C pendant au moins quarante-huit heures, en conservant toute sa coagulabilité ; elle contient cependant du plasminogène puisque l'addition de streptokinase la rend incoagulable dans un délai de dix à trente minutes (à pH 7,6 et à 37° C).

Streptokinase (SK) du laboratoire Diamant (1).

Thrombine du laboratoire Hoffman-La-Roche.

Inhibiteur de trypsine du soja (SBI), cristallisé du laboratoire Worthington Biochemical Co, dilué dans du tampon phosphate de Na, pH 7,6, 0,005 M et conservé à 4° C.

Produits de fibrinogénolyse. — Ils ont été obtenus par adjonction de SK au fibrinogène dilué dans du tampon phosphate de Na, pH 7,6, 0,05 M à raison de 10 unités de SK pour 1 ml de fibrinogène à 0,5-1,0 p. 100. Après des délais variables d'incubation à 37° C, on prélève des échantillons auxquels on ajoute le SBI pour arrêter l'action enzymatique [5, 6].

La concentration en protéines des produits obtenus a été déterminée en employant le réactif du biuret selon la technique décrite par McDuffie et Kabat [7].

ELECTROPHORÈSE EN MILIEU GÉLIFIÉ. — Elle a été effectuée dans des conditions analogues à celles décrites par Grabar et Williams [8] (gélose à 1 p. 100 dans un tampon véronal sodique pH 8,2, 0,025 M, la couche de gélose ayant une épaisseur de 3 à 4 mm ; tampon dans les cuves électrodes à 0,05 M). L'électrophorèse a été pratiquée soit pendant quatre heures avec une différence de potentiel de 5 V/cm dans le gel (plaques de 13×18 cm), soit pendant une heure et demie avec une différence de potentiel de 8 V/cm (plaques de $10,7 \times 4,4$ cm). Après l'électrophorèse, les plaques ont été fixées puis colorées par le Noir Amide [9], et l'enregistrement photométrique des bandes colorées effectué avec l'enregistreur d'extinction II de Zeiss. La détermination de la mobilité électrophorétique relative a été faite d'après la méthode décrite par Uriel [10], la sérumbumaine humaine étant utilisée comme protéine de référence et le point de mobilité zéro déterminé par une préparation de levane.

CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE de diéthyl-amino-éthyl-cellulose (DEAE) [11, 12]. La DEAE-cellulose (Selectacel du laboratoire Brown, d'une capacité de 0,99 mEq/g) a été activée avec NaOH 1 N puis lavée par l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH neutre. Elle est ensuite lavée à plusieurs reprises avec le tampon initial. La colonne est préparée par sédimentation de la cellulose sous une pression d'environ 40 cm d'eau. Nouveau lavage avec le tampon initial jusqu'à ce que le pH de l'éluat soit identique à celui du tampon. Après passage de la solution de protéine, on procède à un dernier lavage avec quelques ml

(1) Les abréviations suivantes seront utilisées : SK : streptokinase ; SBI : inhibiteur de trypsine du soja ; DEAE : diéthyl-amino-éthyl.

du tampon initial. L'élution est effectuée sous une pression d'environ 40 cm d'eau, en utilisant un gradient de force ionique. Ce gradient a été obtenu par le dispositif cône-sphère de Sober et Peterson [13]. La vitesse d'élution a été d'environ 100 ml/heure pour une colonne qui avait 2,5 cm² de section. L'élution des protéines a été suivie par lecture de la densité optique des éluats à une longueur d'onde de 280 mμ.

ULTRACENTRIFUGATION. — L'ultracentrifugation a été faite au moyen d'une Spinco analytique modèle E en utilisant la vitesse de 59 780 t/mn et un circuit optique type Schlieren, la température du rotor étant déterminée avant et après chaque expérience. Les constantes de sédimentation ont été calculées d'après la mesure du déplacement de l'ordonnée maxima à des temps successifs (au moins 8 photographies à des intervalles de quatre à seize minutes) selon la méthode indiquée par Schachman [14] et les coefficients corrigés pour la densité de l'eau à 20° C. Les constantes de sédimentation faibles ont été déterminées par emploi d'une cellule à frontière synthétique de type capillaire. Les essais n'ont pu être effectués à plusieurs dilutions que pour celui des produits qui était le plus concentré.

CONSTANTE DE DIFFUSION. — Elle a été déterminée selon la technique d'Allison et Humphrey [15] par double diffusion en milieu gélifié. L'immunsérum anti-fibrinogène humain, utilisé pour cette précipitation spécifique provenait de lapins ; la technique d'immunisation est décrite ailleurs [1]. Les plaques ont été maintenues à température constante (18° C). La constante de diffusion des γ-globulines de lapin a été considérée comme étant de $3,8 \times 10^{-7}$ cm² sec⁻¹ [16].

Pour l'une des fractions chromatographiques (B-C, voir RÉSULTATS), une évaluation de la constante de diffusion a été effectuée à partir des données de l'ultracentrifugation, compte tenu de l'apparente monodispersion de cette fraction. On a utilisé la cellule à frontière synthétique à une vitesse de rotation de 12 590 t/mn, puis porté graphiquement pour chaque photographie, la quantité $4 \pi \left(\frac{\Delta}{\Pi} \right)^2$, en fonction du temps.

Nous ignorons le rapport d'axes des différents produits étudiés ; si ce rapport est élevé, certaines de nos données sur les constantes de diffusion pourraient devoir être corrigées.

RÉSULTATS

1° ELECTROPHORÈSE EN GÉLOSE. — Le fibrinogène non dégradé reste, pour la plus grande partie, dans le réservoir de départ. Seule une faible partie du fibrinogène est déplacée vers la cathode. Après action prolongée de la plasmine, on constate l'apparition de plusieurs produits dont les situations après électrophorèse sont différentes de celle du fibrinogène non dégradé (fig. 1).

L'étude d'échantillons prélevés après des délais d'action enzymatique successivement croissants (l'inhibition de la plasmine étant assurée par adjonction de SBI à la concentration finale de 0,3 mg/ml), montre des modifications chronologiques du diagramme électrophorétique. On constate (fig. 1) : a) la persistance, longtemps après la disparition de toute protéine coagulable par la thrombine, de produits dont la situation après électrophorèse

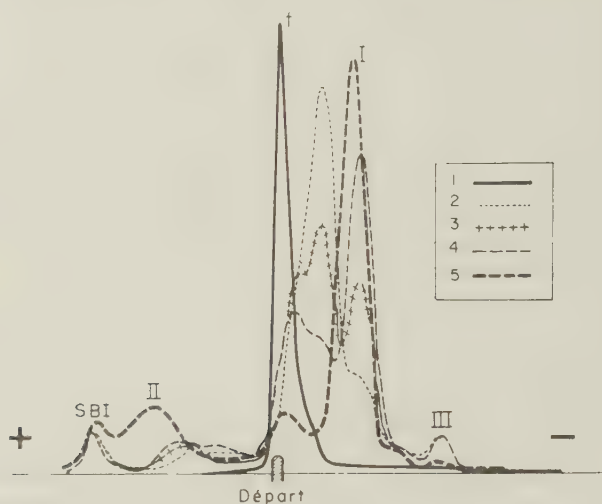


FIG. 1. — Electrophorèse en gélose du fibrinogène et des produits de fibrinogénolyse par la plasmine à différents stades de la dégradation. La courbe 1 est celle du fibrinogène non dégradé (f). Les courbes 2, 3, 4 et 5 correspondent à des délais d'action enzymatique de vingt-deux, quarante, soixante et deux cent quarante minutes. Toute protéine coagulable par la thrombine avait disparu entre dix et vingt-deux minutes d'action enzymatique. I, II et III désignent les principaux pics observés sur les diagrammes. SBI : pic correspondant à l'inhibiteur de la trypsine du soja.

est voisine de celle du fibrinogène natif ; ces produits diminuent progressivement au fur et à mesure que la dégradation se poursuit ; b) l'apparition dans toutes nos expériences de trois groupes essentiels de produits de dégradation ; deux d'entre eux (I et II) apparaissent à des concentrations croissantes au cours de la lyse. Le plus important de ces deux produits (I, fig. 1) a une mobilité intermédiaire entre celles des β et des γ -globulines sériques ; le second groupe de produits (II, fig. 1) migre de plus en plus rapidement, et, au stade terminal, possède une mobilité électrophorétique analogue à celle des α_1 -globulines. Un troisième produit (III, fig. 1) apparaît dès le début de la lyse, atteint une

concentration maxima au moment où toute protéine coagulable a disparu, puis diminue progressivement.

Le pic le plus anodique sur le diagramme de la figure 1 correspond au SBI.

Les diagrammes électrophorétiques obtenus après dix-huit heures d'action enzymatique sont sensiblement analogues à ceux obtenus après un délai de quatre heures ; le pic I est parfois plus étalé.

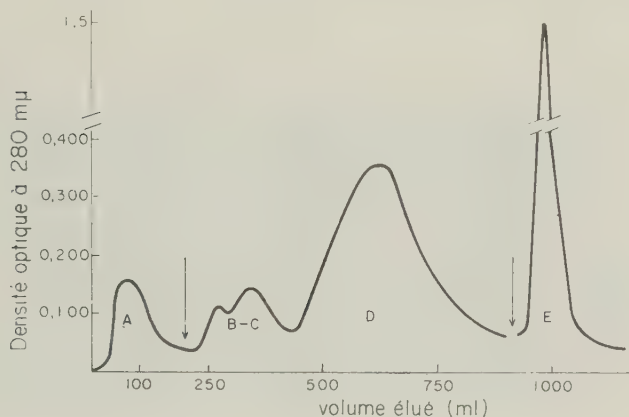


FIG. 2. — Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose des produits de dégradation du fibrinogène par la plasmine. Concentration du fibrinogène soumis à l'action de la plasmine : 6,3 mg/ml. L'action enzymatique a été inhibée au bout de sept heures par addition de SBI (concentration finale 0,5 mg/ml). Les produits de fibrinogénolyse ont été dialysés contre un tampon de carbonate de Na 0,01 M, pH 8,9 et passés sur une colonne de 37 cm de hauteur. L'élution a été faite avec un gradient allant de carbonate de Na, 0,01 M, pH 8,9 jusqu'à carbonate de Na, 0,01 M, pH 8,9 + NaCl 0,10 M. Le commencement et la fin du gradient sont indiqués par les flèches. Après la fin du gradient, l'élution a été effectuée avec un tampon carbonate de Na 0,01 M, pH 8,9 + NaCl 0,2 M. Débit d'élution : 90 ml/h.

2° CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DEAE-CELLULOSE. — Le fractionnement des produits de fibrinogénolyse obtenus après sept heures d'action enzymatique a été effectué dans les conditions précisées au chapitre TECHNIQUES et dans la légende de la figure 2.

Tous les produits ont été retenus par la cellulose. Après élution, on a récupéré la quasi-totalité des protéines soumises à la chromatographie et on a décelé 5 sommets. Les éluats ont été regroupés en 4 fractions (A, B-C, D, E de la fig. 2). Ces fractions ont été ensuite concentrées soit par pervaporation sous pression, soit par passage sur une nouvelle colonne de DEAE-cellulose en

employant pour l'élution un tampon de plus grande force ionique. Les fractions finales ont été dialysées contre une solution de NaCl 0,15 M.

3° PROPRIÉTÉS DES PRODUITS ISOLÉS PAR CHROMATOGRAPHIE. —

A. *Mobilité électrophorétique.* — Les fractions A, D et E ont formé un pic unique et bien défini à l'électrophorèse. Les mobilités des fractions D et E sont respectivement analogues à celles des pics I et II du diagramme de la figure 1. La fraction A migre

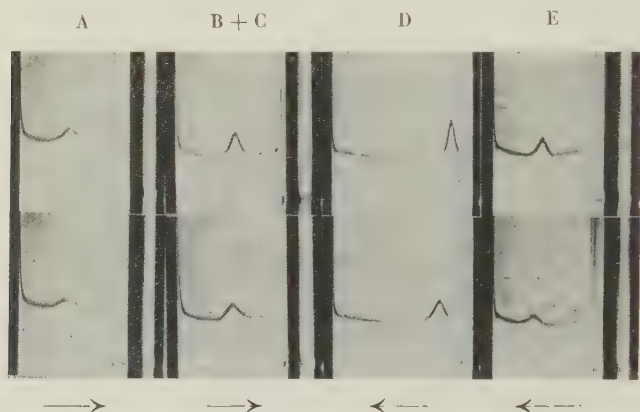


FIG. 3. — Ultracentrifugation des 4 fractions séparées par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose, à partir des produits obtenus après dégradation prolongée du fibrinogène par la plasmine. Les photographies ont été prises à des intervalles de seize minutes. De gauche à droite : fractions A, B + C, D et E.

très lentement. L'électrophorèse de la fraction B-C qui comprenait deux sommets à la chromatographie (fig. 2) a montré deux taches distinctes : l'une au niveau du réservoir de départ et l'autre dans une zone voisine de celle du pic I de la figure 1.

La mobilité électrophorétique de ces différents produits, par rapport à la sérumalbumine humaine est indiquée sur le tableau I.

B. *Constante de sédimentation.* — Chacune des 4 fractions, y compris B-C, a donné un seul pic à l'ultracentrifugation (fig. 3). Leurs constantes de sédimentation sont indiquées sur le tableau I. Pour le produit D, la constante de sédimentation a été déterminée à l'aide de trois préparations différentes, obtenues après des délais d'action enzymatique de sept à dix-huit heures ; les résultats ont été sensiblement identiques.

TABEAU I. — Propriétés des produits obtenus après dégradation prolongée du fibrinogène par la plasmine, séparés par chromatographie sur colonne de D. E. A. E.-cellulose.

FRACTION	DATE	TEMPS D'ACTION DE L'ENZYME (HEURES)	MOBILITE ELECTROPHO- RETIQUE RELATIVE	CONSTANTE DE SEDIMENTA- TION	CONSTANTE DE DIFFUSION APPROXIMA- TIVE	POTDS MOLE- CULAIRE APPROX.	CHAUFFAGE A 56°C 30 min.
			$\frac{U_x}{U_{\text{albumine}}}$	$\frac{S_{20W}}{\text{Protéines}} \left(\frac{\text{mg/ml}}{\text{cm. sec.}} \right)$	$\frac{D}{\text{cm.}^2 \text{ sec.}^{-1}}$		
A	30/3 1960	7	0,21	1,2	0,8		Thermostable
			0,30*				
			0,52(?)	1,5	1,9	13.400	Thermostable
B - C	30/3 1960	7					
			0,30	4,8	3,0		
	19/2 1960	7					
D	26/10 1959	18	0,30	4,7	2,6		
						83.000	Thermostable
E	30/3 1960	7	0,30	4,9 4,9 5,0	3,3 2,2 1,1		
						35.000	Thermostable
			0,94	3,0	1,3		

* Ces deux constituants n'ont pu être séparés par électrophorèse en gélose (Voir texte).

Pour la fraction B-C, la forme de la courbe donnée par le Schlieren a été étudiée selon la méthode de Dieu et Oth [47]. Elle ne permet de mettre en évidence aucune polydispersion nette, sans que l'on puisse toutefois exclure définitivement la possibilité d'une légère hétérogénéité étant donné la faible concentration du produit.

C. *Constante de diffusion.* — Nous n'avons pu la déterminer par la méthode d'Allison et Humphrey que pour les fractions D et E, puisque les autres fractions ne donnent pas de précipitation spécifique avec nos sérums anti-fibrinogène [4]. On voit sur la figure 4 que la pente de la ligne de précipitation donnée



FIG. 4. — Détermination des coefficients de diffusion des produits D et E par la méthode d'Allison et Humphrey. Anti-f = sérum de lapin anti-fibrinogène.

par chacun de ces produits est différente. La constante de diffusion de la fraction B-C a été évaluée selon la méthode indiquée au chapitre TECHNIQUES. Les constantes de diffusion ainsi évaluées sont indiquées sur le tableau I.

Cette donnée, jointe à la constante de sédimentation, permet de calculer le poids moléculaire approximatif de ces produits. En admettant la valeur de 0,725 pour le volume partiel spécifique, le poids moléculaire serait environ de 83 000 pour le produit D, 35 000 pour le produit E et 13 000 pour les produits B et C.

D. *Thermostabilité.* — Le produit D est thermolabile puisque, après chauffage à 56° C pendant une demi-heure, il précipite soit en milieu liquide, soit en gélose. Les autres fractions sont thermostables. Elles ne précipitent pas et leurs mobilités électrophorétiques ne sont pas modifiées après chauffage. En outre, on a obtenu pour le produit E une réaction d'identité avant et après chauffage, par étude de la précipitation spécifique en milieu gélifié, avec un sérum anti-fibrinogène.

DISCUSSION

Les données apportées par la littérature sur la caractérisation des produits de dégradation du fibrinogène par la plasmine sont peu nombreuses.

Plusieurs observateurs [18, 19, 20] ont constaté que la plupart de ces produits doivent être de poids moléculaire relativement élevé puisque, même après une action prolongée de la plasmine, 90 p. 100 environ de ces produits sont encore précipitables par l'acide trichloracétique.

A l'exception de Kaplan [18], tous les auteurs qui ont étudié la dégradation du fibrinogène bovin ont constaté l'apparition de produits ayant des propriétés distinctes de celles du fibrinogène natif. Holmberg [21], puis Seegers [22], ont décrit l'apparition au cours de la lyse de deux produits différents. Plus récemment, on a signalé l'existence de 4 produits de dégradation au cours de la fibrinogénolyse : Shulman [23] distingue 4 pics à l'ultracentrifugation et Sherry [19] mentionne l'existence de 4 taches au moins après chromatographie sur papier. Le travail de Kowalski [20], portant sur le fibrinogène humain, a montré par électrophorèse sur papier, l'apparition d'une série de constituants de mobilités variées.

Aucun de ces auteurs n'a séparé les produits de dégradation et leur caractérisation n'a donc pu être effectuée de façon précise.

L'électrophorèse en gélose (et sur papier) offre des difficultés particulières dans l'étude du fibrinogène et de ses produits de dégradation. En effet, le fibrinogène reste, après électrophorèse, dans le réservoir de départ ou à son voisinage [24, 25]. Ce fait est dû à la précipitation de cette protéine par la gélose [26]; cette précipitation a lieu même si l'on mélange soigneusement le fibrinogène à la gélose à la température du laboratoire. Il en est probablement de même pour certains des produits formés au cours de la fibrinogénolyse; il n'est donc pas toujours possible de définir avec certitude leur mobilité électrophorétique.

La chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose permet, par contre, de dénombrer, dans des conditions satisfaisantes, les produits de fibrinogénolyse. Elle a permis en outre leur fractionnement, première étape de leur caractérisation par la conjonction de plusieurs méthodes telles que électrophorèse, ultracentrifugation, étude de la diffusion et des propriétés immunologiques.

Nos expériences initiales n'avaient permis de fractionner que deux constituants [27]. Mais une proportion importante des produits de fibrinogénolyse n'avait pas été retenue dans la cellulose. Les nouvelles conditions de pH, de force ionique et de gradient

utilisées dans le présent travail ont permis une chromatographie totale et la séparation de 5 constituants à partir des produits d'une dégradation par la plasmine poursuivie pendant sept heures.

L'un de ces constituants (D) représente environ 50 p. 100 des produits de dégradation obtenus. Son poids moléculaire approximatif a pu être calculé ; il est d'environ 83 000. Or le poids moléculaire du fibrinogène non dégradé est de 340 000 ; il est donc hautement probable que chaque molécule de fibrinogène donne naissance à deux de ces fragments. Le produit D a pu être isolé à un état relativement pur, comme en témoignent les données du tableau I et les données immunochimiques [4]. Certaines de ses propriétés (mobilité électrophorétique, thermolabilité) sont analogues à celles du produit α de Seegers [22], obtenu à partir du fibrinogène bovin.

Le constituant E a pu être défini de façon satisfaisante (tableau I). Son poids moléculaire est approximativement de 35 000. Il représente 15 à 20 p. 100 des produits terminaux de fibrinogénolyse. Sa mobilité électrophorétique et sa thermostabilité sont analogues à celles du produit β de Seegers. Les techniques immunochimiques ont prouvé l'existence d'au moins deux impuretés dans la fraction correspondante [4].

Les trois autres constituants (A, B et C) sont présents à des concentrations moins importantes et ont un poids moléculaire plus petit que les précédents. Aucun de ces trois produits ne précipite avec les sérums anti-fibrinogène que nous avons utilisés [4]. Le constituant, A, aisément isolé par chromatographie, a été défini par sa constante de sédimentation et sa mobilité électrophorétique. Les constituants B et C ont donné deux sommets voisins à la chromatographie. Ils ont une constante de sédimentation analogue et l'étude des diagrammes d'ultracentrifugation n'a montré aucune polydispersion nette ; nous devons donc considérer leurs poids moléculaires comme sensiblement identiques. Mais ils sont séparés par électrophorèse en gélose ; l'un de ces produits reste dans le réservoir de départ, si bien qu'on ne peut pas définir avec certitude sa mobilité électrophorétique.

Les 5 constituants qui ont ainsi été définis représentent probablement, dans nos conditions expérimentales, des produits terminaux de la dégradation du fibrinogène par la plasmine en milieu salin. C'est après un délai de sept heures d'action enzymatique que le fractionnement chromatographique a été effectué, alors que, dans cette expérience, toute protéine coagulable par la thrombine avait disparu après un délai compris entre dix et vingt minutes. Or, le diagramme électrophorétique de l'ensemble des produits de lyse ne se modifie pratiquement plus au-delà de quatre heures d'action enzymatique. D'ailleurs, après un délai analogue, le pourcentage des produits non précipitables par

l'acide trichloracétique atteint un plateau. En outre, pour le produit quantitativement le plus important (D), nous savons que la constante de sédimentation reste sensiblement la même après des délais de sept et de dix-huit heures. Il n'est cependant pas exclu que l'enzyme soit inactivée ou inhibée après plusieurs heures d'action et que, après une nouvelle addition de plasmine, la dégradation de nos produits « terminaux » se poursuive.

Mais les diagrammes électrophorétiques successifs de la figure 1 montrent bien la formation, à des stades plus précoces de la fibrinogénolyse, de produits ayant une mobilité différente de celle des 5 constituants que nous avons isolés. Ainsi, on voit nettement l'apparition, dès le début de la lyse, d'un produit lent (III, fig. 2) qui a pratiquement disparu au stade terminal et que nous n'avons donc pas pu isoler dans nos conditions expérimentales. Il est probable que la disparition de ce constituant est due à sa dégradation sous l'action prolongée de la plasmine.

En outre, l'analyse immuno-électrophorétique nous a montré que des produits précurseurs des constituants E et D apparaissent à un stade précoce de la fibrinogénolyse ; dès ce stade, une petite quantité d'un produit ayant les mêmes caractéristiques que D est décelée à l'ultracentrifugation.

L'action de la plasmine sur le fibrinogène est donc progressive avec formation de produits intermédiaires qui sont à leur tour attaqués par l'enzyme. C'est une protéolyse limitée qui aboutit à la formation d'au moins 5 produits distincts de poids moléculaire relativement élevé, dont nous avons pu définir certaines propriétés physico-chimiques.

Il importe de souligner que les conditions expérimentales dans lesquelles a été effectuée cette étude sont très éloignées de celles qui sont réalisées *in vivo*.

RÉSUMÉ.

Les produits obtenus après dégradation du fibrinogène humain par la plasmine pendant un délai de sept heures ont été fractionnés par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose. Les cinq produits ainsi fractionnés ont été étudiés par électrophorèse en gélose, ultracentrifugation et diffusion.

Les deux constituants majeurs ont des propriétés très différentes. L'un, qui représente environ 50 p. 100 de l'ensemble des produits, a une mobilité électrophorétique intermédiaire entre celles des β et des γ -globulines sériques, un poids moléculaire approximatif de 83 000 et est thermolabile. L'autre a une mobilité d' α -globuline rapide, un poids moléculaire d'environ 35 000 et est thermostable.

Le trois autres constituants, qui sont présents à des concentrations moins importantes, ont un plus petit poids moléculaire que les précédents.

Ces cinq constituants semblent représenter les fragments essentiels auxquels aboutit, dans nos conditions expérimentales, l'action de la plasmine sur le fibrinogène. Mais à un stade plus précoce, cette enzyme mène à la formation de produits intermédiaires qui sont à leur tour dégradés.

SUMMARY.

THE DEGRADATION PRODUCTS OF HUMAN FIBRINOGEN BY PLASMIN.

I. SEPARATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES.

The products obtained after 7 hours of degradation of human fibrinogen by plasmin were separated by chromatography on DEAE-cellulose. The five constituents thus obtained were studied by electrophoresis in agar gel, ultracentrifugation and diffusion.

The two major constituents have very different properties. One of them, which represents about 50 p. 100 of the total products, has an electrophoretic mobility between that of the β and γ -globulins of human serum, a molecular weight of approximately 83 000 and is thermolabile. The other product has a mobility similar to that of a fast α -globulin of serum, a molecular weight of approximately 35 000 and is thermostable.

The three other constituents, which are present in lower concentrations, have lower molecular weights than the major constituents.

The five constituents studied seem to represent the essential end products of the reaction of plasmin on fibrinogen, in our experimental conditions. However, at an earlier stage of the degradation, this enzyme produces intermediary products which are themselves further degraded.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] NUSSENZWEIG (V.), SELIGMANN (M.) et GRABAR (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961 (*sous presse*).
- [2] NUSSENZWEIG (V.) et SELIGMANN (M.). *Rev. Hématol.*, 1960, **15**, 451.
- [3] WARE (A. G.), GUEST (M. M.) et SEEGER (W. H.). *Arch. Biochem.*, 1947, **13**, 231.
- [4] BLOMBACK (B.). *Arkiv Kemi*, 1958, **12**, 99.
- [5] TAGNON (H. J.) et SOULIER (J.-P.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1946, **61**, 440.
- [6] GROB (D.). *J. gen. Physiol.*, 1950, **33**, 103.

- [7] MC DUFFIE (F. C.) et KABAT (E. A.). *J. Immunol.* 1956, **77**, 193.
- [8] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A.). *Biochim. Biophys. Acta.*, 1955, **17**, 67.
- [9] URIEL (J.) et GRABAR (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 427.
- [10] URIEL (J.). *Clin. Chim. Acta*, 1958, **3**, 384.
- [11] SOBER (H. A.) et PETERSON (E. A.). *J. Am. chem. Soc.*, 1954, **76**, 1711.
- [12] PETERSON (E. A.) et SOBER (H. A.). *J. Am. chem. Soc.*, 1956, **78**, 751.
- [13] SOBER (H. A.) et PETERSON (E. A.). *Fed. Proc.*, 1958, **17**, 1116.
- [14] SCHACHMAN (H. K.). *Methods in enzymology*, 1957, **4**, 32. Academic Press. Inc., New York.
- [15] ALLISON (A. C.) et HUMPHREY (J. H.). *Immunol.* 1960, **3**, 95.
- [16] KABAT (E. A.) et MAYER (M. M.). *Experimental Immunochemistry*, p. 168, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1948.
- [17] DIEU (H.) et OTH (H.). *Bull. Soc. Chim. Belge*, 1954, **63**, 424.
- [18] KAPLAN (E. H.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **85**, 142.
- [19] SHERRY (S.) et ALKJAERSIG (N.). *Thrombosis diathesis hemorragica*, 1957, **1**, 264.
- [20] KOWALSKI (E.), BUDZYSKI (A.), KOPEC (M.) et MURAWSKI (K.). *Blood*, 1960, **15**, 164.
- [21] HOLMBERG (C. G.). *Arkiv Kemi*, 1944, 17 A, n° 28.
- [22] SEEGER (W. H.), NIEFT (M. L.) et VANDENBELT (J. M.). *Arch. Biochem.*, 1945, **7**, 15.
- [23] SHULMAN (S.). *Fed. Proc.*, 1955, **14**, 281.
- [24] SELIGMANN (M.), GOUDEMAND (B.), JANIN (A.), BERNARD (J.) et GRABAR (P.). *Rev. Hématol.*, 1957, **12**, 302.
- [25] SALMON (J.). *Clin. Chim. Acta.*, 1959, **4**, 767.
- [26] WIEME (R. J.). *Studies on agar-gel electrophoresis. Techniques, applications*, p. 188, Arscia Uitgaven N. V., Bruxelles 1959.
- [27] NUSSENZWEIG (V.) SELIGMANN (M.) et GRABAR (P.). *Protides of biological fluids*, 8th Colloquium, Bruges, 1960, Elsevier édit., Amsterdam (sous presse).

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e)

Séance du 10 janvier 1961.

(La séance a eu lieu par correspondance)

COMMUNICATIONS

ÉTUDE SUR LE MÉTABOLISME DES LEPTOSPIRES.

ESSAI DE MILIEU CHIMIQUEMENT DÉFINI

par Marcel MAILLOUX et Berthe KOLOCHINE-ERBER.

(Institut Pasteur)

De nombreux milieux de culture ont été proposés pour entretenir les leptospires au laboratoire. Cette pluralité de milieux laisse à penser que la question n'est pas simple. Les plus utilisés ont tous un inconvénient majeur : la nécessité d'y incorporer du sérum de lapin, sans lequel les leptospires végètent pendant quelques passages, puis meurent.

Or, le sérum de lapin est très gênant pour les études sur le métabolisme, les besoins nutritifs, les facteurs de croissance, ainsi que pour les recherches sur les antigènes des leptospires. Plusieurs expérimentateurs ont essayé des milieux dont il était éliminé ou ont cherché à le remplacer par les composants chimiquement définis dont l'ensemble reconstitué pourrait fournir au milieu les qualités nécessaires à la culture des leptospires. Savino et Rennella [14] auraient réussi à cultiver des souches de *L. ictero-hemorrhagiae* dans un milieu composé uniquement de sels, d'acides aminés, de vitamines, d'hématine. Mais ces résultats n'ont pas été confirmés. Greene et ses collaborateurs [9, 10, 13, 15, 16] ont essayé sans succès un milieu où le sérum de lapin était remplacé par un mélange d'acides

et de vitamines dont l'analyse du sérum de lapin avait démontré la présence. Ils ont réussi cependant à mettre en évidence, dans le sérum de lapin, l'existence de deux facteurs nécessaires à la croissance des leptospires ; l'un dialysable pouvant être remplacé par la peptone et l'asparagine, l'autre non dialysable pouvant être remplacé par la sérumbumine de lapin mais non par un mélange d'acides aminés. Pour Ono [42], pour Stuart [47], ces facteurs pourraient être remplacés au moins en partie par l'asparagine. Rosenfeld et Greene [43], estiment que le facteur sérique de croissance ne serait pas de nature protéique.

Dans les laboratoires où l'on cultive les leptospires on sait que l'hémoglobine [4] est nécessaire à la multiplication (Savino et Rennella [14] l'ont démontré) et on ajoute toujours de l'hémoglobine au milieu de culture.

De nombreux essais ont été faits pour trouver une substance qui, ajoutée au milieu contenant du sérum, favorisât le développement des leptospires : ce sont d'abord les acides aminés qui ont été éprouvés par Ward et Starbuck [48], Greene [9, 40], Marshall [41], Ono [42], Schneiderman, Greene et coll. [45, 46], Savino et Rennella [14]. Ces essais sont peu concluants et les résultats souvent contradictoires : selon la constitution du milieu de culture un même amino-acide inhibe ou favorise le développement des germes. Les vitamines ont été étudiées à ce point de vue par Gram [7, 8], Yoshida [49], Ward et Starbuck [48], Rosenfeld et Greene [43], Greene, Schneiderman et coll. [45, 46]. Celles du groupe B favorisent le développement des leptospires. Gram [7, 8] préconise un mélange de cocarboxylase, de vitamine B₁ et d'acide nicotinique et de nicotinamide.

Chitov [6] a proposé un milieu sans sérum, constitué par du bouillon de foie, additionné de vitamine B₁ (thiamine). Ce milieu est très favorable à la culture de *L. ictero-hemorrhagiae* et, d'après l'auteur, la croissance des leptospires y est plus rapide et plus abondante que dans les milieux au sérum.

Babudieri et Zardi [2, 3, 4] ont étudié le métabolisme des leptospires, le rôle de la vitamine B₁₂ et celui d'autres facteurs de croissance des leptospires : les bases puriques et pyrimidiques. Ils ont noté aussi une différence nette de comportement des leptospires pathogènes et des leptospires saprophytes aquicoles : pour les premiers, la vitamine B₁₂ est un facteur de croissance permettant de réduire les proportions du sérum (sans le supprimer) ; pour les seconds, la vitamine B₁₂ pourrait le remplacer complètement.

Dans leurs expériences, Babudieri et Zardi ont employé un milieu où n'entre pas le sérum de lapin. Ce milieu a pour base les éléments de celui de Korthof auxquels les auteurs ajoutent 0,1 µg par ml de cyanocobalamine. La formule n'est pas explicitement indiquée.

Depuis plus d'un an, l'étude de la croissance des leptospires dans des milieux dépourvus de sérum de lapin et celle du rôle de la vitamine B₁₂ comme facteur de croissance ont fait l'objet du programme de recherches du Laboratoire des Leptospiroses.

Le milieu utilisé ne comprend que des produits simples pouvant

être fournis par l'industrie. Il a pour base certains éléments entrant dans la composition du milieu de Stuart [17].

Eau physiologique à 8,5 p. 1 000	50 ml
Tampon de Sørensen (1)	50 ml
Solution d'asparagine (2)	10 ml
Tampon glycolle (3)	20 ml
Vitamine B ₁₂ (4)	100 µg
Eau distillée	370 ml p. 500 ml

Le pH est ajusté à 7,5.

Pour l'étude de ce milieu chimiquement défini, la technique des passages successifs et celle du lavage-centrifugation pour éliminer les traces de sérum de lapin ont été utilisées. La première permet d'accoutumer plus lentement les leptospires au changement de milieu.

Les leptospires pathogènes ne poussent pas dans cette nouvelle condition. Ils présentent rapidement des formes de souffrance et des mouvements saccadés. Leur multiplication s'arrête, puis ils se lysent.

Nous avons donc expérimenté avec des souches de leptospires saprophytes isolées de l'eau d'étangs ou de rivières : cinq d'entre elles ont donné des réponses qui sont à retenir.

F : souche de leptospire aquicole isolée d'un étang (étang 3), Thiron-Gardais (Eure-et-Loir, 1948).

H : souche de leptospire aquicole isolée de la Bénoué (affluent du Niger, 1953).

O : souche de leptospire aquicole isolée de l'Eure à Maintenon, en septembre 1959.

P : souche de leptospire aquicole isolée de l'Eure à Chambray, en aval de Maintenon, en octobre 1959.

Saâda : souche de leptospire aquicole isolée d'une séguia d'irrigation près de Saâda dans la plaine de Marrakech, en 1960.

Quinze passages des quatre premières souches (un tous les dix ou quinze jours) ont été faits jusqu'à maintenant, depuis le 1^{er} avril 1960. Chaque ensemencement a été effectué à la pipette Pasteur. L'inoculum représentait en volume environ le 1/10 du milieu neuf : avant le repiquage, chaque culture était examinée au microscope sur fond noir, aux points de vue vitalité et richesse.

(1) Solution tampon Sørensen (pH 7,5) soit :

Na ₂ H PO ₄ (12 H ₂ O)	11,876 g p. 1 000
K ₂ H PO ₄	9,078 g p. 1 000

la solution à pH 7,5 est obtenue en mélangeant :

95 ml de solution de phosphate de sodium,
5 ml de solution de phosphate de potassium.

(2) Asparagine (droite) M/10 13,2 p. 1 000

(3) Tampon au glycolle : ajouter 2,5 ml de NaOH, 1 N, à 975 ml de glycolle 0,1 M ; ajouter 10 g de NaCl, et compléter ce mélange à 1 000 ml avec de l'eau distillée ; ajuster le pH à 8,2.

(4) La vitamine B₁₂ nous a été aimablement fournie par les Laboratoires Roussel, et nous remercions ici les D^{rs} Frette et Gorrand.

Dans ce milieu, les cultures de leptospires aquicoles sont moins abondantes qu'en milieu de Reiter et Ramme. Cependant l'examen au microscope décèle au moins 20 à 30 leptospires par champ et souvent plus.

Des témoins faits avec le même milieu privé de vitamine B₁₂ ont été négatifs : les leptospires meurent après une lyse rapide.

La survie des leptospires dans ce milieu a été aussi étudiée. D'anciennes cultures de la souche H sont conservées au laboratoire depuis décembre 1959 : elles sont examinées périodiquement ; ces cultures sont toujours riches, les leptospires y sont nombreux et bien vivants : ils présentent parfois encore des formes de division, il n'y a pas trace de lyse. Dans ce milieu vitaminé et dans le milieu de Reiter et Ramme au sérum de lapin, les repiquages montrent une croissance normale.

Pour compléter l'étude de la survie, nous avons examiné le comportement des souches H et Saâda exposées à des températures basses. Ces deux souches en milieu chimiquement défini ont été placées au congélateur à -20° et d'autres tubes ont été mis à la glacière à $+4^{\circ}$. Ces températures ont été maintenues pendant quatre jours. Après séjour de cinq heures à température du laboratoire, les leptospires sont normaux, leurs mouvements actifs ; après repiquage en milieu de Reiter, ou en milieu chimiquement défini, leur croissance est active.

D'autre part, des lavages-centrifugations de cultures ont été répétés quatre fois afin de débarrasser les leptospires de toute trace de sérum.

Les souches de leptospires pathogènes *L. ictero-hemorrhagiae*, *L. grippo-typhosa*, *L. pomona*, *L. bataviae*, ensemencées dans le milieu chimiquement défini, végètent mal et présentent des formes de souffrance, puis se lysent à partir du troisième passage.

Mais les leptospires aquicoles (souche Saâda, *L. biflexa* souche Patoc II, les souches F, H, O, P) se multiplient dans ce milieu après passages successifs ; la souche Igel se maintient pendant 6 passages au moins.

Pour chaque expérience, et à chaque repiquage, estimant que le simple examen morphologique ne suffit pas toujours, ont été faits des témoins en milieu de Reiter et Ramme afin de vérifier la vitalité ou la mort des germes. Des leptospires apparemment morts, immobiles, peuvent très bien, reportés en milieu de Reiter, se multiplier et croître à nouveau ; le repiquage ne pousse pas dans le milieu sans sérum.

Les leptospires semblent se diviser en deux groupes :

1° Les leptospires pathogènes parasites, pour lesquels la présence du sérum de lapin est absolument indispensable au développement, à la multiplication et à une longue survie. L'addition de vitamine B₁₂ joue un rôle favorisant et permet de diminuer la quantité de sérum.

2° Les leptospires saprophytes aquicoles, qui peuvent croître sur un milieu chimiquement défini composé d'eau, de sels minéraux, d'acides aminés (base du milieu de Stuart) et de vitamine B₁₂ (ce qui confirme, avec un milieu différent, les résultats de Babudieri).

La vitamine B₁₂ est donc une substance dont le leptospire est

incapable de réaliser la synthèse, et en l'absence de laquelle la multiplication sur notre milieu de base est impossible ; c'est donc un facteur de croissance, c'est-à-dire un métabolite essentiel, nécessaire au développement des leptospires, et qu'il faut obligatoirement leur fournir.

RÉSUMÉ. — Exposé des résultats obtenus avec un milieu de culture chimiquement défini et contenant de la vitamine B₁₂. Seuls y croissent les souches de leptospires aquicoles saprophytes. Après quinze repiquages, ou après 3-4 lavages-centrifugations et quelques passages, les leptospires se développent bien dans ce milieu ; ils y restent actifs et s'y multiplient ; on y observe des divisions. Les leptospires pathogènes n'y poussent pas.

On peut donc diviser le genre *Leptospira* en deux groupes :

1° Les leptospires pathogènes parasites, pour lesquels la présence de sérum est indispensable ; 2° les leptospires saprophytes aquicoles qui se développent dans un milieu sans sérum, à condition d'ajouter aux sels minéraux et aux amino-acides de la vitamine B₁₂ qui est donc un facteur de croissance pour les leptospires saprophytes.

SUMMARY.

STUDIES ON THE METABOLISM OF LEPTOSPIRAE. ATTEMPTS AT CULTIVATION ON A SYNTHETIC MEDIUM.

After a rapid survey of the metabolism and growth requirements of leptospirae, a medium without serum is described for the cultivation of saprophytic ones. Pathogenic leptospirae do not grow in this medium.

After fifteen subcultures, or after three-four washings and centrifugations before seeding, the germs are still active and there are divisions in subcultures.

Leptospirae can be divided into two groups : 1° pathogenic leptospirae, the culture of which is not possible without serum ; 2° saprophytic ones, the culture of which is possible without serum in a medium containing inorganic salts, amino-acids with addition of vitamin B₁₂ as growth factor.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] ADAMSKI (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 1206-1207.
- [2] BABUDIERI (B.). *Rendiconti dell' Ist. Sup. di Sanità*, 1944, **7**, 532.
- [3] BABUDIERI (B.) et ZARDI (O.). *Atti del IX° Congresso Nazionale di Microbiologia*. Palermo, 5-7 avril 1956.
- [4] BABUDIERI (B.) et ZARDI (O.). *Nuovi Ann Igiene Microbiol.*, 1959, 121-128.
- [5] BABUDIERI (B.) et ZARDI (O.). *R. C. Istit. sup. Sanità*, 1959, **22**, 246-259.
- [6] CHITOV (K. A.). *J. Microbiol., Epidémiol., Immunobiol.*, 1954, **3**, 74-77.
- [7] GRAM (M. G.). *Z. Hyg.*, 1953, **137**, 553-559.
- [8] GRAM (M. G.) et SCHLIPKOETER (H. W.). *Aertzl. Forsch.*, 1953, **7**, 97.
- [9] GREENE (M. R.). *J. Bact.*, 1945, **50**, 39-45.
- [10] GREENE (M. R.), CAMIEN (M. N.) et DUNN (M. S.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1950, **75**, 208-211.

- [11] MARSHALL (P. B.). *J. inf. Dis.*, 1949, **84**, 150-151.
[12] ONO (S.). *Fukuoka Acta Med.*, 1938, **34**, 155-158.
[13] ROSENFELD (W. D.) et GREENE (M. R.). *J. Bact.*, 1941, **42**, 165-172.
[14] SAVINO (E.) et RENNELLA (E.). *Leptospira y leptospirosis en la Republica Argentina*. Buenos Aires, 1944, Thomas Palumbo.
[15] SCHNEIDERMAN (A.), GREENE (M. R.), SCHIELER (L.), Mc CLURE (L. E.) et DUNN (M. S.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1951, **78**, 777-780.
[16] SCHNEIDERMAN (A.), GREENE (M. R.), SCHIELER (L.), Mc CLURE (L. E.) et DUNN (M. S.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1953, **82**, 53-56.
[17] STUART (R. D.). *J. Path. Bact.*, 1946, **58**, 343-349.
[18] WARD (T. G.) et STARBUCK (E. B.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1941, **48**, 19.
[19] YOSHIDA (N.). *Fukuoka Acta Med.*, 1939, **32**, 88-89.

INFLUENCE DE DIVERS AGENTS DE CHIMIOTHÉRAPIE ANTICANCÉREUSE SUR LA PRODUCTION D'HÉTÉRO-HÉMAGGLUTININES CHEZ LE POULET

par S. ORBACH-ARBOUYS (*) et A. EYQUEM.

(Laboratoire de Chirurgie, Hôpital Paul-Brousse, Villejuif,
et Laboratoire d'Hématologie et des Groupes Sanguins, Institut Pasteur)

L'influence favorable de divers antimétabolites sur l'évolution des greffes chez l'animal a été observée par Schwartz [3] et Uphoff [5]. L'action de ces antimétabolites a été attribuée à leur intervention sur la synthèse des protéines, notamment à l'inhibition de la formation des anticorps.

Nous nous sommes proposé de comparer l'action de divers antimétabolites, des agents alkylants et des antibiotiques. L'action de ces différentes substances chimiques est encore mal connue ; leur constitution est très voisine de celle des métabolites naturels avec lesquels ils entrent en compétition. Il nous a semblé intéressant de voir si divers agents utilisés en chimiothérapie anticancéreuse avaient le même effet dépresseur sur la synthèse des anticorps.

On dispose à l'heure actuelle de plusieurs types de produits actifs : les antimétabolites, les agents alkylants et les antibiotiques.

Les antimétabolites sont des substances chimiques dont la constitution est très voisine de celle des métabolites naturels ; agissant par compétition avec ceux-ci, ils sont capables d'entraver la biosynthèse des acides nucléiques.

(*) Attachée de Recherches au C. N. R. S.

Les agents alkylants sont définis comme susceptibles de réaliser le blocage par alkylation de divers groupements, notamment les groupements COOH , PO_4 , NH_2 , OH et SH présents dans les protéines et les nucléoprotéines. Le blocage de ces groupements conduit à des lésions biochimiques et provoque, en particulier, la dénaturation de l'acide désoxyribonucléique qui constitue une cible de choix pour les composés de ce type.

Les doses utilisées et les modalités de l'administration sont le reflet de celles pratiquées en clinique humaine, puisque celles-ci ont été déterminées de façon à obtenir un effet antitumoral maximum, sans atteindre l'effet toxique (aplasie médullaire).

Les substances essayées ont été les suivantes :

1° Parmi les antimétabolites : la 6-mercapto-purine, indiquée dans le traitement de la leucose lymphoblastique.

2° Parmi les agents alkylants :

a) dérivés à groupement bêta-chloréthyle ou moutardes, en particulier dans la série aromatique : le chlorambucil (ou CB 1348, ou chloraminophène) = (acide para-bis-bêta-chloro-éthyl-amino-phényl-butérique), indiqué principalement dans le traitement de la leucose lymphoïde chronique ;

b) dérivés à groupement éthylène-imine, en particulier les phosphoramides : le thiotepa ou $\text{NN}'\text{N}''$ triéthylène-thiophosphoramide, efficace dans différents cancers ;

c) dérivés à groupement ester-sulfonique : le Myleran ou di-méthyl-sulfonoxyl-4-butane à action élective sur la série myéloïde.

3° Parmi les antibiotiques : l'actinomycine D, à pouvoir cytostatique incontestable sur l'animal.

Nous avons effectué la première partie de cette étude en comparant les réponses obtenues chez les poulets témoins et chez les poulets traités. Le poulet avait l'avantage de répondre rapidement à un stimulus antigénique, ce qui permettait d'apprécier aisément l'action des inhibiteurs. Les études réalisées chez d'autres animaux feront l'objet d'une note ultérieure.

TECHNIQUE. — On opère sur des lots de cinq ou six animaux de 1500 g environ.

Les animaux témoins reçoivent par voie intraveineuse 0,1 ml de globules rouges humains du groupe O en suspension dans l'eau physiologique. On effectue le prélèvement de sang par ponction cardiaque, avant l'injection de la suspension antigénique, ainsi qu'aux cinquième et dixième jours. Cinq groupes d'animaux ont été mis en expérience parallèlement.

1° La 6-mercaptapurine a été administrée par voie intramusculaire à raison de 2,5 mg par jour et par poulet, au rythme de 8 injections quotidiennes, avant l'injection de l'antigène et 9 fois après. Les échantillons de sang ont été prélevés aux mêmes dates que chez les témoins.

2° Le chloramphénicol a été injecté par voie intramusculaire à raison de 0,5 mg par jour et par poulet, dont 12 injections avant et 9 après.

3° Le thio-tepa a été injecté à raison de 3 mg par poulet par voie intrapéritonéale, pour le premier et le deuxième jour, et 1,5 mg aux troisième,

sixième, septième et huitième jours. La suspension antigénique a été faite au quatrième jour et le prélèvement aux neuvième et quatorzième jours.

4° Le Myleran a été injecté à raison de 1 mg quotidiennement par poulet par voie intramusculaire, douze fois avant la suspension antigénique et neuf fois après.

5° L'actinomycine-D a été injectée à raison de 10 mg quotidiennement par poulet par voie intramusculaire, huit fois avant et neuf fois après la suspension antigénique.

Les échantillons de sang ont été recueillis sur héparine ; le plasma est séparé après centrifugation ; ceci permet d'obtenir une plus grande quantité de l'échantillon étudié qu'avec le sang coagulé, car la rétraction du caillot ne fournit qu'une faible quantité de sérum.

Le titrage de l'hémagglutinine se fait par dilutions successives des plasmas dans l'eau physiologique et sous un volume de 0,5 ml, et par contact avec une suspension à 2 p. 100 des globules rouges lavés provenant d'un donneur du groupe O. On apprécie le titre de l'agglutination après centrifugation pendant trois minutes à 1 000 t/min.

RÉSULTATS. — Les animaux témoins répondent de manière assez homogène au stimulus antigénique. Le titre de l'agglutinine atteint

	AVANT	5 ^e JOUR	10 ^e JOUR		AVANT	5 ^e JOUR	10 ^e JOUR
<i>Animaux témoins</i>				<i>Animaux recevant la 6-mercaptopurine</i>			
P. 24	160	5 120	1 280	P. 30	40	40	640
P. 25	160	5 120	5 120	P. 31	20	640	320
P. 26	320	5 120	5 120	P. 32	10	1 280	2 500
P. 27	640	20 000	5 120	P. 33	40	2 500	1 280
P. 28	80	5 000	5 120	P. 34	40	320	5 000
P. 29	640	1 280	1 280				
<i>Animaux recevant le Myleran</i>				<i>Animaux recevant le chlorambucil</i>			
P. 18	80	2 500	10 000	P. 7	160	5 120	2 560
P. 19	20	40 000	5 000	P. 8	160	40	80
P. 20	40	80 000	160 000	P. 9	160	20 000	10 000
P. 21	40	2 500	5 000	P. 10	320	5 120	640
P. 22	80	2 500	80 000	P. 11	manque	5 120	160
P. 23	20	5 000	320 000				
<i>Animaux recevant le thio-tepa</i>				<i>Animaux recevant l'actinomycine D</i>			
P. 12	80	40 000	10 000	P. 36	20	640	640
P. 13	160	10 000	5 000	P. 37	20	40	80
P. 14	80	80 000	160 000	P. 38	40	160	1 280
P. 15	320	40 000	5 000	P. 39	40	1 280	640
P. 16	160	80 000	80 000	P. 40	80	320	1 280
P. 17	640	80 000	320 000				

son maximum au cinquième jour et on trouve la même valeur au dixième jour.

Les animaux traités peuvent être divisés en deux groupes :

1° Dans le premier groupe, les animaux présentent une diminution du titre de l'agglutinine par rapport aux témoins : il en est ainsi après traitement par la 6-mercaptapurine, le chlorambucil et l'actinomycine D.

Les animaux traités au chlorambucil occupent une position intermédiaire, puisque le titre de l'agglutinine observé au cinquième jour est voisin de celui observé chez les témoins, mais il y a une diminution très nette au dixième jour.

L'actinomycine D provoque une très nette diminution du titre de l'agglutinine, bien que le titre au dixième jour soit supérieur à celui observé au cinquième.

Chez les animaux traités à la 6-mercaptapurine, on trouve un titre inférieur à celui des témoins ; ce titre a la même valeur au cinquième et au dixième jour.

Ces résultats étaient prévisibles d'après les observations antérieures ; par contre l'augmentation du titre de l'agglutinine après traitement par certains agents (2° groupe) ne pouvait pas être soupçonnée.

2° Les animaux traités avec le Myleran ou le thiotepa présentent, au cinquième jour, une très forte augmentation du titre dont la valeur atteint 1/80 000 pour la moitié d'entre eux. Il y a au dixième jour augmentation de ce titre pour certains animaux et diminution pour d'autres.

DISCUSSION. — Les variations de titre des hétérohémagglutinines ont été observées chez le lapin. L'inhibition est maximum dans le cas de l'hémagglutinine anti-mouton après irradiation X à raison de 6 doses de 125 r en deux semaines et lorsque la suspension antigénique est injectée deux jours après la dernière des 6 séances d'irradiation (Taliaferro [4]). Chez la souris, l'inhibition est surtout marquée lorsque l'irradiation est pratiquée un jour avant ou une heure après la deuxième injection immunisante [2].

Le mécanisme de ces inhibitions est encore discuté. Il est évident que l'inhibition observée pour une espèce donnée peut ne pas se manifester chez une autre espèce. Par contre, aucun élément ne permettait de prévoir l'augmentation très nette du titre agglutinant observé après injection d'antimétabolites dont la puissance est reconnue.

RÉSUMÉ. — Chez les poulets traités par la 6-mercaptapurine, le chlorambucil ou l'actinomycine D, le titre de l'hétérohémagglutinine observé aux cinquième et dixième jours après une injection unique de globules rouges humains du groupe O est plus faible que chez les poulets témoins. Au contraire, chez les poulets traités par le Myleran ou le thiotepa, le titre de l'hétérohémagglutinine est supérieur à celui des poulets témoins.

SUMMARY

INFLUENCE OF CERTAIN CHIMIOTHERAPEUTIC ANTI-CANCEROUS AGENTS
ON THE FORMATION OF HETERO-HEMAGGLUTININS IN CHICKEN.

In chicken injected with 6-mercapto-purine, chlorambucil and actinomycin D, the hetero-hemagglutinin titer (five and ten days after a single injection of human O red cells) is lower than in controls. In chicken injected with Myleran and thiotepea, this titer is higher than in controls.

*
*
*

Nous remercions le Dr Ch. Southam du Sloan Kettering Institute (N. Y.) de nous avoir fait parvenir le thiotepea utilisé dans cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FISCHER (B.). *Transplant. Bull.*, 1959, **6**, 432-433.
- [2] MAKINODAN (T.), FRIEBERG (B. H.), TOLBERT (M. G.) et GENGOZIAN (N.). *J. Immunol.*, 1959, **83**, 184-188.
- [3] SCHWARTZ (R.), STACK (J.) et DAMESHEK (W.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1958, **99**, 164.
- [4] TALIAFERRO (W. H.) et TALIAFERRO (L. G.). *J. inf. Dis.*, 1957, **104**, 85-99.
- [5] UPHOFF (D. E.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1958, **99**, 651-653.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Etude de la croissance de *Cl. sporogenes*. — I. Actions comparées de certains sels de nickel et de cobalt, par M. FAGUET.

Effets de l' α -chymotrypsine sur le tissu sous-cutané du rat, par M^{lle} S. BAZIN, MM. P. COMTE et A. DELAUNAY.

Action bactéricide du yaourt sur les *Mycobactéries*, par A. TACQUET, F. TISON et B. DEVULDER.

ELECTIONS

MM. Camus, Klein, Lagarde, Monnet, Portmann, Rougieux ; M^{mes} Cabau, Triadaphylli, sont élus membres de la Société Française de Microbiologie.

MM. Cochrane, van Heynigen, Isaacs, Kabat, Pereira, Seeliger, Tasman, Westphal, sont élus membres associés.

LIVRES REÇUS

G. Popjak. — *Biochemistry of lipids*. 1 vol., 228 p., Pergamon Press, 1960. Prix : 40 shillings.

Dans ce volume sont réunies les communications présentées lors de la 5^e Conférence internationale sur la Biochimie des Lipides, tenue à Vienne en septembre 1958 lors du IV^e Congrès international de Chimie Biologique. Ces 54 publications portent sur des sujets très divers ayant trait aux substances lipides (acides gras, glycérides, phosphatides, acétal-phosphatides, stérols, etc.) : propriétés physicochimiques, procédés analytiques, méthodes de synthèse, enzymologie, étude des constituants lipidiques des animaux et des végétaux et de leur métabolisme au cours des états physiologiques ou pathologiques.

On regrette que les travaux disparates exposés à cette conférence n'aient pas été centrés sur des sujets délimités, introduits par une mise au point générale de la question et aboutissant aux discussions des participants.

M. F.

Comité d'experts de la Tuberculose. Septième rapport. *Organisation mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques*, 1960, n° 195, 19 p. Prix : Fr. s. 1, --, 1/9 ou \$ 0,30. Publié également en anglais et en espagnol (Dépositaire pour la France, Librairie Masson, Paris).

E. G. Wagner et J. N. Lanoix. — *Evacuation des excréta dans les zones rurales et les petites agglomérations*. *Organisation mondiale de la Santé : Série de Monographies*, n° 39, 196 p. Genève, 1960. Prix : £ 10 s., \$ 4,00 ou Fr. s. 12, --. Publié également en anglais et en espagnol (Dépositaire pour la France, Librairie Masson, Paris).

H. A. Goddard. — *Principes d'administration des services infirmiers*. *Organisation mondiale de la Santé : Série de Monographies*, n° 41, 106 p., Genève, 1960. Prix : Fr. s. 6, --, 10/-, \$ 2,00. Publié également en anglais et en espagnol (Dépositaire pour la France, Librairie Masson, Paris).